N° d'ordre : 167

THESES

présentées
A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE LYON
pour obtenir
le titre de DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LYON
(Mention Sciences)
par

Georges ZWINGELSTEIN
Licencié Es-Sciences

PREMIÈRE THÈSE

Actions Biologiques de quelques Acides insaturés substitués

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

Soutenues le 25 Mars 1960 devant la Commission d'Examen

MM. D. CORDIER	Président
J. CHOPIN	Examinateurs
G. PÉRÈS	
C. MENTZER	

N° d'ordre : 167

T H E S E S

présentées

A LA FACULTE DES SCIENCES DE LYON

pour obtenir

le titre de DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LYON
(Mention Sciences)

par

Georges ZWINGELSTEIN
Attaché de Recherches au C.N.R.S.
Licencié ès-Sciences

-:-:-:-:-:-

Première Thèse

"ACTIONS BIOLOGIQUES DE QUELQUES ACIDES INSATURES SUBSTITUES"

Deuxième Thèse

PROPOSITIONS DONNEES PAR LA FACULTE

-:-:-:-:-:-

Soutenues le 25 mars 1960

devant la Commission d'Examen :

MM. D. CORDIER, Président
J. CHOPIN)
G. PERES) Membres du Jury
C. MENTZER)

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

UNIVERSITE DE LYON - FACULTE DES SCIENCES

Doyens Honoraires

MM. LONGCHAMBON
DOUIN

Professeurs Honoraires

MM. LOCQUIN
de LARAMBERGUE
DOEUVRE
SOLLAUD
MENTZER

Doyen

M. GAUTHIER H.

Assesseur

M. PRETTRE

Professeurs

MM. LONGCHAMBON	Minéralogie
DOUIN	Botanique
GAUTHIER H.	Géologie
DEJARDIN	Physique générale
THIBAUD	Physique nucléaire
EYRAUD Henri	Calcul différentiel et intégral
PRETTRE	Chimie industrielle
COURTY	Chimie-physique
KUHNER	Microbiologie et Mycologie
CORDIER	Physiologie
MALECOT	Mécanique rationnelle et appliquée
PARIS	Chimie minérale
AUMERAS	Chimie
COLONGE	Chimie organique
JANIN	Physique générale
FLANDRIN	Géologie appliquée
BERNARD René	Physique industrielle
DUFAY	Astronomie
NIGON	Zoologie expérimentale
VIRET	Géologie
WAUTIER	Zoologie
CHOPIN	Chimie biologique
BRACONNIER	Mathématiques
CUEILLERON	Chimie
EYRAUD Charles	Chimie minérale
BOUTILLIER	Minéralogie
BOIDIN	Botanique
JAFFARD	Mathématiques
MESNARD	Physique

Maîtres de Conférences

MM.	LAFOUCRIERE	Physique nucléaire
	LAVIOLETTE	Zoologie
	GRANDMONTAGNE	Physique
	GIGOUT	Géologie
	TEICHNER	Chimie industrielle
	DREUX	Chimie organique
	DEPRAZ	Physique nucléaire
	FERON	Mathématiques
	PISTOULET	Physique générale
	GAUME	Physique
	PACHECO	Chimie biologique
	PAVANS DE CECCATY	Zoologie
	MERLIN	Chimie M.P.C.
	PHILBERT	Physique nucléaire
	PERES	Physiologie
	LAFORGUE	Physique
	BERSILLON	Physiologie végétale S.P.C.N.
	LEGAY	Zoologie expérimentale S.P.C.N.
	UZAN	Physique S.P.C.N.
	DAVID Louis	Géologie
	GAUTHIER Jean	Chimie

Maîtres de Conférences Adjoints

MM.	PIERRON	Chimie
	CHENEVOY	Géologie appliquée

Chargés de Cours Complémentaires

Mme	FIASSON	Zoologie
MM.	PENNANEAC'H	Mathématiques générales
	BERNARD Roger	Physique
	COTILLON	Géologie appliquée
	STRIFFLING	Météorologie et Physique du Globe
	MAZENOT	Géologie - Agrégation
	MURET	Botanique - Agrégation
	FIASSON	Zoologie - Agrégation
	TRANCHAT	Physique-Chimie Agrégation
	SALLES	Mathématiques
	PERNOUX	Physique
	EYRAUD Y.	Physique
	BENE	Physique

SECRÉTAIRE

M. ROUX

A ma Femme et à mes Enfants,

A mes Parents,

A mes Beaux-Parents.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550011_0047

A LA MEMOIRE DE NOTRE MAÎTRE,

Monsieur le Professeur P. MEUNIER

Il a été notre initiateur dans l'étude de la Biochimie et des vitamines en particulier et a su, par son intuition et sa très grande personnalité, créer pour nous une ambiance propice à la recherche.

Que ceci soit un faible témoignage de notre profonde gratitude.

A Monsieur C. MENTZER,

Professeur honoraire à la Faculté des Sciences de Lyon,
Professeur de Chimie au Muséum National d'Histoire Naturelle

En faible témoignage de notre admiration pour son enthousiasme et son esprit créateur dans le domaine de la recherche scientifique.

A V A N T - P R O P O S.

Le présent travail a été réalisé au Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté des Sciences de Lyon, grâce à l'appui matériel du CENTRE NATIONAL de la RECHERCHE SCIENTIFIQUE que nous remercions ici.

Avant de l'exposer, qu'il nous soit permis d'exprimer à Monsieur le Professeur C. MENTZER notre sincère gratitude. C'est lui qui nous a inspiré le sujet de ce travail et nous avons souvent eu recours à ses vastes connaissances en Chimie organique. La nouvelle marque d'estime qu'il nous témoigne en acceptant de faire partie de ce jury nous touche profondément et nous lui disons ici toute notre respectueuse reconnaissance.

Nous tenons également à remercier Monsieur le Professeur J. CHOPIN d'avoir toujours suivi avec bienveillance l'évolution de nos recherches et d'avoir bien voulu accepter de juger ce travail. Qu'il nous soit permis de lui témoigner toute notre gratitude.

Nous présentons à Monsieur le Professeur D. CORDIER nos très vifs remerciements pour l'honneur qu'il nous fait en acceptant de présider notre Jury et pour les nombreux conseils qu'il nous a prodigués, à l'occasion de ce travail.

Nous sommes heureux d'exprimer notre sympathie et nos remerciements à Monsieur G. PERES, Maître de Conférences de Physiologie, qui a bien voulu accepter de faire partie de ce Jury.

Nous remercions aussi très vivement Messieurs H. THIERS, Professeur de Clinique Dermatologique, J. COUDERT, Professeur de Parasitologie et de Pathologie Exotique, et R. KEHL, Professeur d'Histologie, de la Faculté de Médecine de Lyon, pour la compréhension qu'ils ont eu à notre égard.

Nos remerciements vont également à tous nos Camarades de laboratoire, sans oublier ceux qui se sont éloignés. A Jacques JOUANNETEAU en particulier, nous rappellerons qu'il nous a accueillis comme néophyte au Laboratoire de Chimie Biologique, en 1949.

I/ - INTRODUCTION GENERALE.

Depuis 1940, et surtout à la suite des travaux fonfamentaux de WOODS (183) et FILDES (59) sur l'antagonisme du couple d'analogues structuraux : acide p-amino-benzoïque et p-aminosulfamide, la notion de ressemblance chimique, dans les actions antagonistes ou synergiques des molécules organiques, a apporté dans le domaine de la biologie une nouvelle méthode de recherche.

Au moyen de diverses substances, on peut soit activer, soit inhiber un métabolisme particulier, ce qui permet d'obtenir des résultats statistiquement plus significatifs au cours de son étude biochimique.

Mais le problème primordial dans cette voie reste l'édification de composés analogues structuraux de métabolites essentiels. Il ne suffit pas en effet de préparer un corps chimique ayant une ressemblance de structure pour avoir à coup sûr l'antimétabolite cherché. Evidemment, certaines règles, telles que le remplacement d'un atome d'hydrogène par un radical alcoyle, ou d'un groupement acide -COOH par un groupe cétonique $-CO-CH_3$, permettent d'aboutir quelquefois à des résultats. Mais, dans chaque cas particulier, on doit chercher la façon de transformer le composé envisagé pour obtenir son antagoniste.

C'est en utilisant ces principes que nous avons effectué les recherches sur les acides $\beta\gamma$-insaturés dont nous allons exposer les résultats.

1°) INTRODUCTION.

Au cours de ces dernières années, un grand nombre de travaux sur la biogénèse de différentes substances biologiques ont pu être entrepris, par suite des facilités de plus en plus grandes apportées dans l'emploi des molécules marquées, au moyen d'un isotope radioactif d'un des atomes la constituant. Les synthèses de ces molécules comportant par exemple un atome de ^{14}C radioactif, bien étudiées, sont devenues assez simples et les appareils de détection, rendus d'un maniement plus aisé, ont été en outre perfectionnés, permettant des mesures quantitatives de radioactivité assez faible.

Tous ces facteurs ont entraîné une évolution très rapide des études portant sur les métabolismes intermédiaires ; en particulier, l'étude de la biogénèse des substances stéroliques a été assez vite transformée par ces nouvelles méthodes.

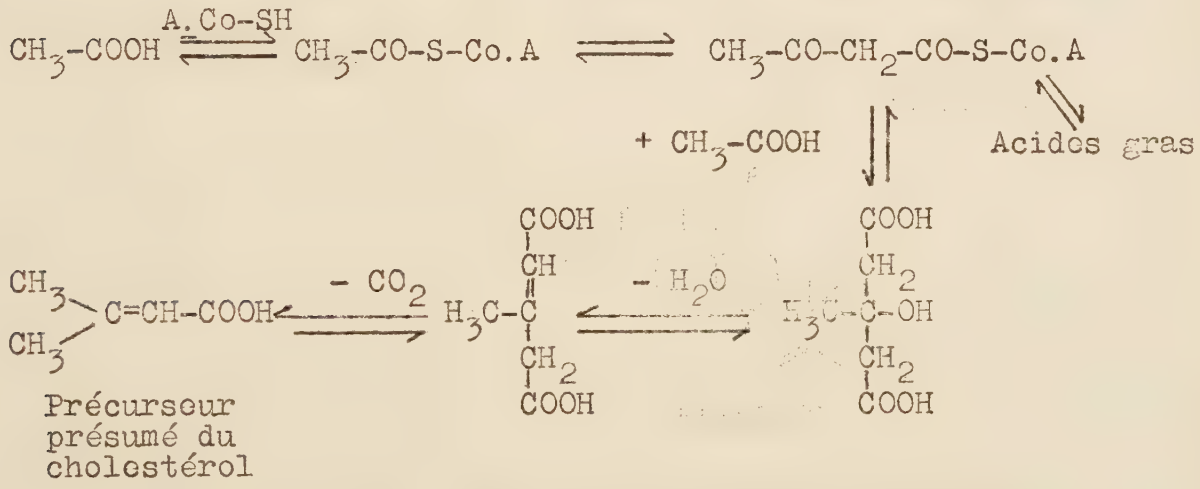
Au moment où nous avons commencé l'étude des substances inhibitrices de la biosynthèse du cholestérol chez les animaux, les différentes étapes de la synthèse de cette molécule par les organismes vivants avaient été étudiées par un certain nombre d'auteurs et c'est, partant de leurs conclusions temporaires quant aux différentes phases de ce métabolisme, que nous avons entrepris la recherche d'analogues structuraux des molécules intermédiaires. Nous verrons que certains résultats obtenus dans cette voie s'expliquent aisément à la suite des derniers travaux et des dernières hypothèses sur les étapes biochimiques de la formation du noyau stérolique et en particulier de la molécule de cholestérol chez l'animal.

2°) HYPOTHESE DE RECHERCHE.

Dès 1955, BLOCH, RITTENBERG et LYNEN (18, 16, 115) pouvaient déjà préciser les voies biochimiques de la transformation de l'acide acétique en lipides, cholestérol et acides gras in vivo.

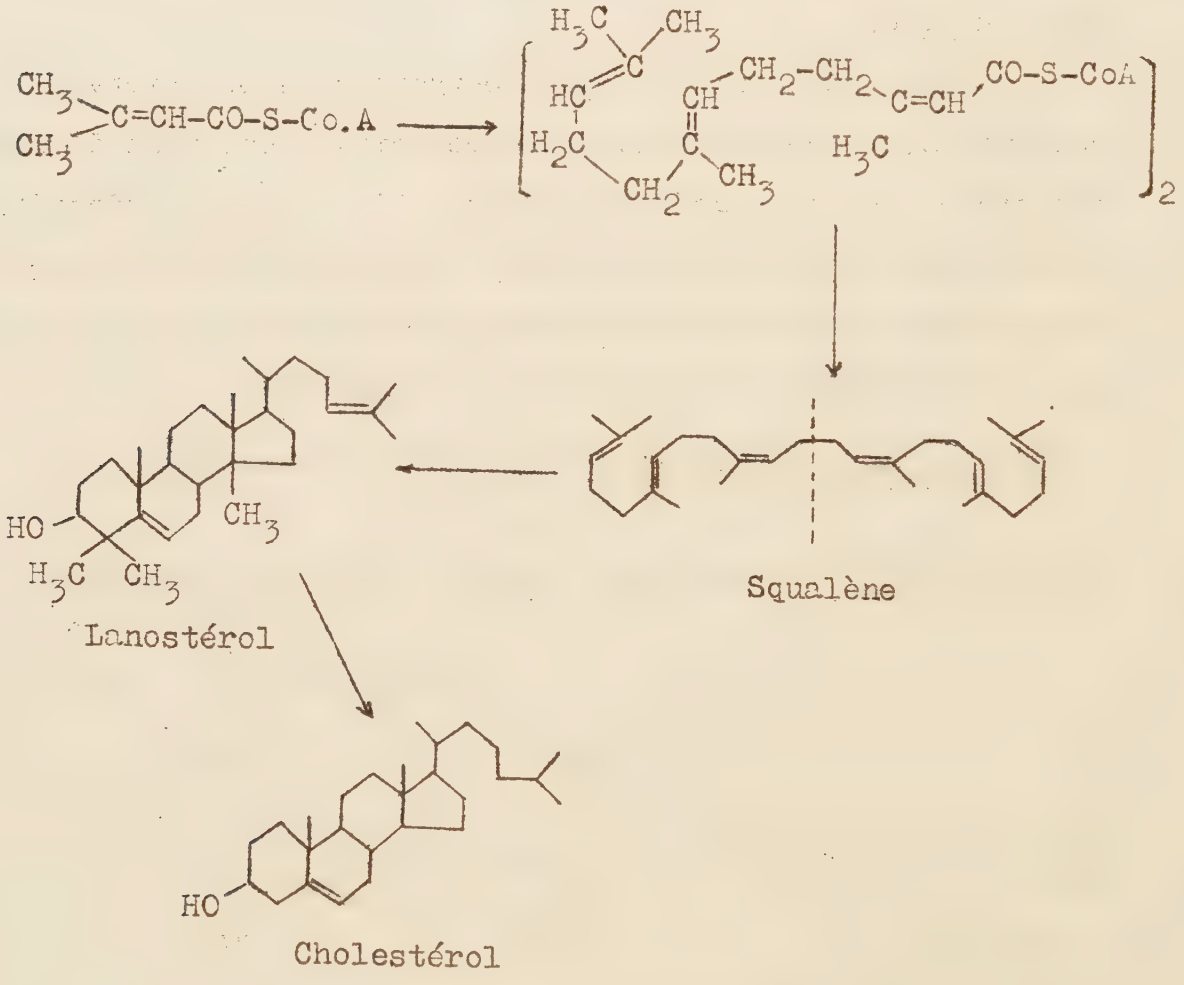
Par une série de réactions enzymatiques où intervient le coenzyme A, l'acétate sous sa forme activée est tout d'abord transformé en acide acétyl-acétique (25, 4) qui, condensé de nouveau avec une molécule d'acide acétique, fournit, après déshydratation et décarboxylation, l'acide diméthyl-acrylique, précurseur direct de la molécule de cholestérol.

Synthèse du cholestérol d'après WOODWARD et BLOCH (184) :



Ce schéma de la biosynthèse de l'acide diméthyl-acrylique, précurseur présumé, en 1955, de la molécule de cholestérol, montre clairement la relation étroite existant entre la biosynthèse des acides gras et celle des stérols. Ultérieurement, par polymérisation de cet acide, il se forme du squalène qui, après cyclisation en lanostérol, est finalement transformé par l'organisme animal en cholestérol (34).

La polymérisation de l'acide diméthyl-acrylique et sa transformation en stérol se feraient, toujours d'après WOODWARD et BLOCH, par l'intermédiaire d'unité en C_{15} (acide farnésique par exemple).



Ce schéma résume toute une série d'expériences effectuées in vitro et in vivo au moyen de molécules radioactives ; il ne fait que suggérer la complexité de cette synthèse dont la plupart des étapes intermédiaires nous sont encore inconnues. Cependant, il nous permet de comprendre et de montrer les différentes possibilités existantes pour bloquer la biosynthèse du cholestérol.

3°) ANALOGUES STRUCTURAUX DES PRECURSEURS DU CHOLESTEROL.

On sait en effet qu'il est possible d'inhiber un processus biochimique en introduisant dans la chaîne réactionnelle qui le constitue une substance analogue structurale d'un des métabolites, ce que D.W. WOOLLEY (185) a appelé un antimétabolite, qui peut ainsi bloquer cette chaîne réactionnelle en inhibant un des enzymes qui y participe ou en diminuant la vitesse d'utilisation d'un des métabolites normaux.

Ainsi, il est peut-être possible d'inhiber la synthèse du cholestérol en introduisant dans la chaîne de réactions précédemment décrite une molécule ayant une analogie structurale avec un des précurseurs envisagés.

Des essais dans ce sens ont été tentés, pour la première fois, par J. COTTET et Collaborateurs (137, 36) qui ont réussi à ralentir la biosynthèse du cholestérol en bloquant la chaîne de réactions au niveau de l'acide acétique lui-même. Ces auteurs ont tout d'abord voulu simplifier la molécule d'acide cholique, tout en lui conservant son pouvoir cholérétique. L'acide α-phényl α-éthyl acétique qu'ils ont ainsi essayé a effectivement donné les résultats prévus et, en plus, cet acide, analogue structural de l'acide acétique, s'est révélé au cours de l'expérimentation biologique comme un antagoniste de ce dernier. Par la suite, d'autres composés apparentés à l'acide acétique ont été proposés comme antagonistes de cette molécule. On peut citer : l'acide diphényl-éthyl-acétique, qui est maintenant un des plus actifs inhibiteurs connus de la biosynthèse du cholestérol.

Le mode d'action de ces inhibiteurs s'explique par une compétition au niveau du coenzyme A qui, détourné de sa voie nor-

male, se fixe sur l'analogue structural, ce qui provoque ainsi la diminution de l'intégration de l'acide acétique dans les molécules plus complexes (144, 64).

Mais, dans ce cas, l'inhibition porte également sur la synthèse de constituants biologiques autres que le cholestérol, tel que les graisses (65), ainsi que sur le processus de détoxication par acétylation (64).

C'est pourquoi nous avons pensé qu'il était peut-être plus intéressant d'essayer de bloquer la chaîne réactionnelle en un point où les métabolites étaient plus directement orientés vers la synthèse du cholestérol (124).

Les acides diméthyl-acrylique (ou méthyl-3 butène-2 oïque)

$$CH_3 - \underset{\underset{CH_3}{|}}{C} = CH - COOH$$

et méthyl-3 glutaconique (ou méthyl-3 pentène-3 dioïque-1,5)

$$COOH - CH = \underset{\underset{CH_3}{|}}{C} - CH_2 - COOH$$

qui constituent les derniers maillons avant les polymères plus fortement condensés en carbone nous ont semblé être les corps qu'il était possible d'antagoniser.

Nous avons donc effectué, d'après les bases théoriques de l'analogie structurale (123), la synthèse de divers composés de structure générale :

$$R - \underset{\underset{R'}{|}}{C} = CH - COOH \quad (I) \qquad \text{et} \qquad R - CH = \underset{\underset{R'}{|}}{C} - CH_2 - COOH \quad (II)$$

où les radicaux R et R' sont constitués par des chaînes carbonées plus ou moins longues ou par des radicaux aromatiques.

Remarquons que le remplacement de la fonction acide par une fonction cétone a également été envisagé dans le cas de l'acide diméthyl-acrylique mais, les composés obtenus s'étant révélés toxiques, leur étude n'a pas été poursuivie.

4°) PLAN DE TRAVAIL.

Dans une première partie, nous décrirons les méthodes de synthèse chimique, de dosages colorimétriques et pondérales, et d'essais biologiques utilisées au cours de ce travail.

Dans une deuxième partie, consacrée à la détermination de l'action hypocholestérolémiante des composés obtenus, nous étudierons la variation de cette activité en fonction de la structure chimique et nous rechercherons le mode d'action de quelques-uns des produits parmi les plus actifs.

Dans une troisième partie, nous envisagerons l'effet de quelques-uns de ces acides sur le tractus génital mâle et femelle du rat et nous essayerons de déterminer le mécanisme biochimique de l'action antimasculinisante de quelques-uns des composés étudiés.

II/ - PREMIERE PARTIE :

EXPOSES DES TECHNIQUES EXPERIMENTALES.

1°) PREPARATIONS CHIMIQUES DES ACIDES INSATURES.

1 - Etude théorique.

La plupart des composés qui ont été étudiés comme hypocholestérolémiants ont été préparés par déshydratation des acides β-hydroxylés correspondants.

a) Préparation des β -hydroxy-esters.

Les esters β -alcools sont facilement obtenus par la réaction de REFORMATSKY (138, 139) qui consiste à condenser le monobromacétate d'éthyle avec un aldéhyde ou une cétone en présence de zinc.

$$\begin{matrix} R \\ R' \end{matrix}\!\!>\!C = O \;+\; BrCH_2 - COOC_2H_5 \xrightarrow{Zn} \begin{matrix} R \\ R' \end{matrix}\!\!>\!\underset{\displaystyle OH}{\underset{|}{C}} - CH_2 - COOC_2H_5$$

Cette réaction s'effectue en général au sein d'un solvant anhydre, en particulier le benzène. Il est nécessaire d'utiliser un zinc spécial (Prolabo n° 29.076), de le sècher à l'étuve plusieurs jours auparavant, mais sans dépasser la température de 60° C.

Nous avons utilisé le mode opératoire général suivant pour obtenir l'ester-alcool :

Dans un ballon muni d'un réfrigérant à reflux efficace, on dissout 1/10 de mole de cétone dans 75 cm3 de benzène séché sur sodium ; on ajoute ensuite 8 g de zinc en grains et 1,2/10 de mole de bromacétate d'éthyle. Puis on amorçe la réaction par un léger chauffage à la flamme ; en général, la réaction se déclanche, sinon on ajoute un grain d'iode. Lorsqu'un violent dégagement de bulles apparaît, on coupe le chauffage et laisse se dérouler la réaction qui devient exothermique. Après

arrêt de l'ébullition du benzène, on maintient pendant 45 minutes le reflux à la flamme ; on laisse refroidir, verse le contenu du ballon (dans lequel la majorité du zinc a disparu) dans 250 cm3 d'acide sulfurique à 20 % froid. On décante la couche benzénique, lave à l'eau jusqu'à neutralité. Par évaporation du solvant, on obtient une huile fortement colorée que l'on distille sous vide pour arriver à l'ester β-hydroxylé pur.

b) Déshydratation des β -hydroxy-esters.

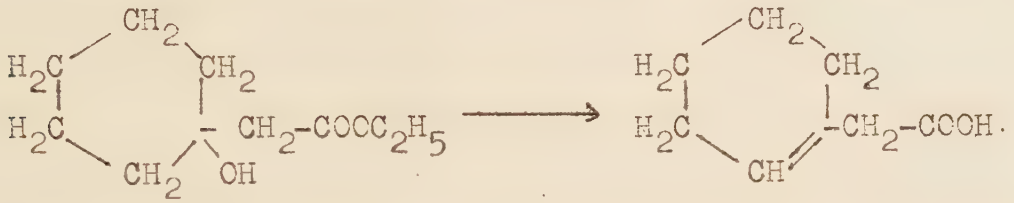
La déshydratation peut être obtenue en chauffant le β-hydroxy-ester avec l'anhydride acétique (164), l'acide formique anhydre (8, 37, 11) ou par reflux dans le benzène anhydre en présence d'anhydride phosphorique (101) ou d'oxychlorure de phosphore (101).

Beaucoup d'autres déshydratants ont d'ailleurs été proposés. Les rendements en produits bruts sont en général satisfaisants. Mais, dans tous les cas, on obtient un mélange des isomères αβ et βγ -insaturés. Les proportions relatives de chacun de ces isomères varient avec le déshydratant utilisé.

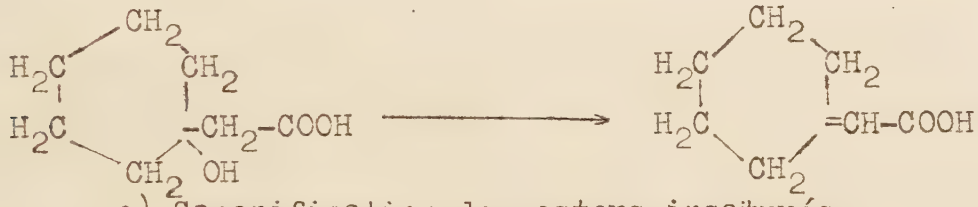
KON et Collaborateurs (97) donnent les proportions relatives suivantes, dans le cas d'une déshydratation en présence d'anhydride phosphorique ou d'oxychlorure de phosphore :

		P_2O_5	$POCl_3$
$C_2H_5-C(CH_3)(OH)-CH_2-COOC_2H_5$	αβ	39 %	62 %
	βγ	61 %	38 %
$C_2H_5-C(C_2H_5)(OH)-CH_2-COOC_2H_5$	αβ	23 %	68 %
	βγ	77 %	32 %

Il est cependant possible, dans certains cas particuliers, d'obtenir un seul des isomères par déshydratation (179), ainsi, la déshydratation de l'hydroxy-1 cyclohexyl acétate d'éthyle par l'anhydride acétique, suivie de la saponification de l'ester insaturé obtenu, fournit l'acide cyclohexényl-1 acétique



alors que la déshydratation de l'acide hydroxy-1 cyclohexyl acétique par l'anhydride acétique conduit à l'acide cyclohexylidène acétique



c) Saponification des esters insaturés.

La saponification de l'ester insaturé obtenu pose encore le problème du déplacement de la double liaison $\alpha\beta$ et $\beta\gamma$. En effet, il existe en milieu alcalin un équilibre entre les deux formes : $\alpha\beta \rightleftharpoons \beta\gamma$; or, la vitesse de déplacement de cet équilibre au cours d'un chauffage en présence de soude dépend de la structure des composés (100).

Comme cette vitesse, d'après les travaux de KÜSTER (104) et LOWRY (112) sur la cinétique des réactions unimoléculaires réversibles, est proportionnelle à la mobilité du système exprimée par la formule :

$$\frac{\log_e \left(\frac{y}{y - x}\right)}{t}$$

où x = concentration (en g de sel de potassium par cm3 d'eau) au temps t (en heures), de l'acide soumis à l'isomérisation,

et y = valeur de x lorsque l'équilibre d'isomérisation est atteint,

KON et LINDSTEADT (100) ont convenu de déterminer expérimentalement les différentes valeurs de x, y et t en effectuant l'isomérisation de l'acide à 100° C en présence d'une solution aqueuse de potasse à 25 %.

Dans ces conditions, l'existence d'un substituant en 2 ou 3 sur la chaîne principale modifie la mobilité de la double liaison.

La double liaison de l'acide hexénoïque présente une mobilité de 153, alors que celle de l'acide méthyl-3 pentènoïque n'est que de 26.

De plus, l'équilibre final atteint est différent dans chaque cas.

En position d'équilibre (après 24 heures en présence d'éthylate de sodium), l'acide hexénoïque comprend :

- 92 % d'acide $\alpha\beta$ -insaturé, et
- 8 % d'acide $\beta\gamma$ -insaturé,

tandis que l'acide méthyl-3 pentènoïque est constitué par un mélange de - 75 % d'isomère $\alpha\beta$ -insaturé

et de - 25 % d'isomère $\beta\gamma$ -insaturé,

après chauffage pendant 120 heures dans l'éthylate de sodium.

Dans le cas des acides substitués en 2 ou 3, l'équilibre est très long à se réaliser, ce qui limite l'isomérisation.

En général, nous avons utilisé une saponification des esters insaturés consistant en une ébullition à reflux en pré-

sence de potasse alcoolique à 10 %. La variation de la proportion des isomères au cours de cette opération paraît très faible dans ces conditions (108).

Les pourcentages relatifs des deux isomères αβ et βγ-insaturés peuvent être déterminés dans ces essais par la méthode de KON (98). Cette méthode basée sur la différence de vitesse de fixation de l'iode sur la double liaison αβ ou βγ donne, avec une bonne précision, le pourcentage de chacun des isomères, à condition d'avoir des isomères purs pour établir la courbe d'étalonnage. Pour l'étude de la composition de nos produits, nous avons utilisé une méthode spectrographique :

En se basant sur le fait que les acides ou les esters αβ-insaturés possèdent un maximum d'absorption vers les longueurs d'onde de 207 à 210 mμ avec une valeur du coefficient d'extinction moléculaire pratiquement constante dans la série aliphatique alors que les acides βγ-insaturés n'ont qu'une très faible absorption vers ces longueurs d'onde. Il est possible de déduire la proportion de chacun des isomères αβ et βγ-insaturés de la mesure du coefficient d'extinction moléculaire $\underline{e}$ du mélange des acides αβ et βγ-insaturés.

Soit e_1 le coefficient d'extinction du composé αβ-insaturé à 210 mμ et e_2 celui du composé βγ-insaturé à la même longueur d'onde, la proportion d'acide αβ-insaturé nous sera donnée par la relation :

$$n\ \%\ \text{de}\ \alpha\beta = \frac{100\ e_2 - e}{e_2 - e_1}$$

où $\underline{e}$ représente le coefficient d'extinction mesuré pour le mélange considéré.

Cette méthode appliquée à l'acide méthyl-pentène-oïque, préparé par déshydratation au moyen d'une ébullition de 3 h. dans l'acide formique suivie d'une saponification par la potasse, nous a fourni le chiffre de 22 % d'acide αβ-insaturé présent dans l'acide après distillation, alors que la méthode de KON donne 25 %.

Nous avons d'ailleurs vérifié la validité de ces résultats en préparant les dérivés cristallisés de ces composés.

Nous avons préparé l'amide des acides méthyl-3 pentène-3 oïque et méthyl-3 pentène-2 oïque, par condensation du chlorure d'acide de chacun de ces composés avec l'ammoniaque.

La préparation du chlorure d'acide s'effectue par ébullition à reflux au bain-marie de 0,2 mole d'acide avec 0,27 mole de chlorure de thionyle (convenablement purifié) pendant 30 minutes. On évapore sous vide pour éliminer $SOCl_2$ en excès, puis on distille le chlorure d'acide.

$$CH_3 - CH_2 - \overset{\overset{CH_3}{|}}{C} = CH - COCl \quad (I) \quad Eb_{25mm} = 65° \text{ C.}$$

$$CH_3 - CH = \overset{\overset{CH_3}{|}}{C} - CH_2 - COCl \quad (II) \quad Eb_{25mm} = 57° \text{ C.}$$

On ajoute alors le chlorure d'acide (0,1 mole) goutte à goutte dans une solution refroidie d'ammoniaque (0,24 mole) en agitant. Il se forme un abondant précipité blanc. Lorsque l'addition est terminée, le pH doit être encore alcalin. On essore l'amide, lave abondamment à l'eau froide pour éliminer $ClNH_4$ et on sèche sous vide (Rendement : 85 %).

Le point de fusion du produit brut est de :

- 124° C pour l'amide 2,3-éthylénique (théorique : 123-124°),
- 91° C " " 3,4-éthylénique (" : 92-93°).

Le point de fusion mélangé des deux amides (75 % de II + 25 % de I) est de : 78° C. Pratiquement, d'après le point de fusion des amides bruts des deux acides I et II, la proportion d'impuretés dans chacun d'eux ne doit pas dépasser 10 à 12 %.

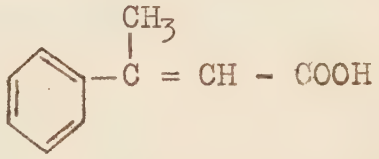
Les acides βγ-insaturés sont particulièrement instables et fournissent facilement la lactone correspondante. Ainsi FICHTER (58) obtient la β-méthyl-valérolactone par une ébullition de quelques minutes de l'acide β-méthyl pentène-3 oïque en présence d'acide sulfurique à 62 %. De même, conservés en flacon bouché à la température de - 15°, ces composés qui donnent facilement un sel de sodium lorsqu'ils sont fraîchement préparés ne présentent plus qu'une réaction faiblement acide au bout de 30 jours de conservation.

Un titrage à la soude indique la disparition de la moitié des fonctions acides au bout de ce laps de temps.

C'est pourquoi nous avons toujours utilisé des composés fraîchement préparés au cours de nos expériences chez l'animal.

2 - Caractéristiques chimiques des composés étudiés.

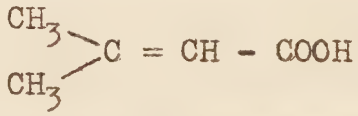
- Acide β-méthyl-cinnamique, F. 98,5° C (151).



préparé par réaction de REFORMATSKY sur l'acétophénone.

Analyse : Calc. %, C 74,07 - H 6,17
Tr. % C 74,18 H 6,17.

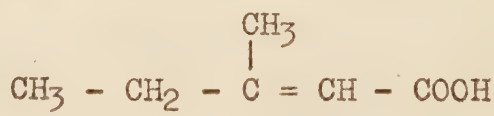
- Acide ββ-diméthyl-acrylique, F. 70° C.



préparé par réaction de REFORMATSKY sur l'acétone. L'ester β-hydroxylé est déshydraté et hydrolysé par ébullition pendant 3 h. en présence de 4 parties d'acide formique. Le mélange est distillé à la pression ordinaire ; on obtient du formiate d'éthyle et de l'acide formique. Par distillation sous vide, on sépare l'acide ββ-diméthyl-acrylique, Eb_{40mmHg} = 114° C, qu'on cristallise dans l'eau, F. 70° C.

Analyse : Calc. % pour $C_5H_8O_2$, C 57,72 - H 7,68
Tr. % C 57,43 H 7,78.

- Acide méthyl-3 pentène-2 oïque, F. 45° C (66).



préparé par réaction de REFORMATSKY sur la méthyl-éthyl-cétone. On déshydrate l'acide β-hydroxylé par ébullition de 3 h. dans l'anhydride acétique. L'huile obtenue après distillation, Eb_{20mm} = 121° C, est mise à cristalliser à - 20° C ;

les cristaux sont filtrés à + 5° C et recristallisés dans l'éther de pétrole.

Analyse : Calc. % pour $C_6H_{10}O_2$, C 63,21 - H 8,77
Tr. % C 63,17 H 8,53.

Amide : F. 92° C, après cristallisation dans le benzène (92).

- Acide méthyl-3 pentène-3 oïque, Eb = 199° C (58).

$$CH_3 - CH = \overset{CH_3}{\overset{|}{C}} - CH_2 - COOH$$

obtenu par déshydratation de l'acide β-alcool correspondant, par ébullition de 2 h.30 dans l'acide sulfurique à 12 % (99), Rendement = 30 %.

Cet acide contient 10 % d'isomère αβ-insaturé.

Nous avons également préparé ce composé par déshydratation et transestérification de l'hydroxy-ester au moyen d'une ébullition de 3 h. dans 5 parties d'acide formique. La distillation lente du mélange fournit du formiate d'éthyle, de l'acide formique puis, en continuant la distillation sous vide, l'acide brut, Eb_{14mm} = 100-103° C. L'acide huileux ainsi préparé est laissé plusieurs jours à -20° C, ce qui permet d'éliminer par cristallisation l'acide αβ-insaturé présent.

Après cette opération, le pourcentage d'isomère αβ est de 12 %.

Analyse : Calc. % pour $C_6H_{10}O_2$, C 63,21 - H 8,77
Tr. % C 62,96 H 8,65.

Amide : F. 124° C, après cristallisation dans le benzène.

Sel de calcium : paillettes blanches, Analyse :

Calc. % pour $(C_6H_9O_2)_2Ca$, H_2O, C 50,75 - H 7,03 - Ca 14,1
Tr. % C 50,27 H 7,26 Ca 13,9

- Méthyl-3 pentène-3 oyl-glycocolle, F. 100° C.

$$CH_3 - CH = \overset{CH_3}{\underset{|}{C}} - CH_2 - CO - NH - CH_2 - COOH$$

préparé par combinaison du chlorure d'acide avec le glycocolle dissous dans l'eau en présence de soude. Le produit est recristallisé dans l'acétate d'éthyle. Flocons blancs, F. 99-100° C.

Analyse : Calc. % pour $C_8H_{13}O_3N$, C 56,12 - H 7,65 - N 8,18
Tr. % C 55,73 H 7,45 N 8,32

- Acide éthyl-3 pentène-2 oïque, Eb_{23mm} = 129° C (99).

$$C_2H_5 - \overset{C_2H_5}{\underset{|}{C}} = CH - COOH$$

préparé par réaction de REFORMATSKY sur la diéthyl-cétone, puis déshydratation de l'acide β-hydroxylé par ébullition dans l'anhydride acétique.

Analyse : Calc. % pour $C_7H_{12}O_2$, C 65,59 - H 9,45
Tr. % C 65,53 H 9,34.

Amide : F. 89° C.

Par ébullition de 20 minutes dans la potasse à 60 %, on obtient la transformation d'une grande proportion de cet acide en son isomère βγ-insaturé.

- Acide éthyl-3 pentène-3 oïque, Eb = 217° C (99).

$$CH_3 - CH = \overset{C_2H_5}{\underset{|}{C}} - CH_2 - COOH$$

obtenu par déshydratation de l'ester β-hydroxylé par chauffage à 160-180° C pendant 3 h. avec 2 parties de sulfate acide de potassium.

L'ester βγ-insaturé, Eb_{24mm} = 95° C, est saponifié par ébullition dans la potasse alcoolique, ce qui fournit l'acide correspondant, Eb_{24mm} = 133-134° C.

Proportion d'isomère αβ -insaturé : 12 %

Analyse : Calc. % pour $C_7H_{12}O_2$, C 65,59 - H 9,45
Tr. % C 65,41 H 9,26.

Amide : F. 113-114° C.

Sel de calcium : cristaux blancs, Analyse :

Calc. % pour $(C_7H_{11}O_2)_2Ca$, C 57,10 - H 7,47 - Ca 13,6
Tr. % C 56,87 H 7,19 Ca 13,7

- Ethyl-3 pentène-3 oyl-glycocolle, F. 68° C.

$$CH_3 - CH = \overset{\overset{C_2H_5}{|}}{C} - CH_2 - CO - NH - CH_2 - COOH$$

préparé comme pour le dérivé de l'acide méthyl-3 pentène-3 oïque.

Analyse : Calc. % pour $C_9H_{15}O_3N$, C 58,32 - H 8,12 - N 7,57
Tr. % C 58,08 H 7,87 N 7,68.

- Acide méthyl-3 hexène-3 oïque, Eb. = 222° C (140).

$$CH_3 - CH_2 - CH = \overset{\overset{CH_3}{|}}{C} - CH_2 - COOH$$

préparé par réaction de REFORMATSKY sur la méthyl-propyl-cétone. L'ester β -hydroxylé, déshydraté par chauffage avec le sulfate acide de potassium pendant 3 h., est saponifié par la potasse alcoolique, ce qui fournit l'acide βγ-insaturé, Eb_{23mm} = 140-141° C.

Pourcentage d'isomère αβ -insaturé : 8 %

Analyse : Calc. % pour $C_7H_{12}O_2$, C 65,67 - H 9,37
Tr. % C 65,25 H 9,08.

- Acide méthyl-3 heptène-3 oïque, Eb_{9mm} = 150-154° C.

$$CH_3 - CH_2 - CH_2 - CH = \overset{\overset{CH_3}{|}}{C} - CH_2 - COOH$$

L'ester β -hydroxylé, Eb_{20mm} = 134-135° C, obtenu par réaction de REFORMATSKY sur la méthyl-butyl-cétone, est déshydraté par ébullition dans l'acide formique. Par saponification à la potasse alcoolique, l'acide est obtenu sous forme d'une huile sirupeuse, Eb_{9mm} = 150-154° C.

Pourcentage d'isomère αβ -insaturé : 11 %

Analyse : Calc. % pour $C_8H_{14}O_2$, C 67,52 - H 9,85
Tr. % C 67,73 H10,0

L'acide β -hydroxylé correspondant, Eb_{9mm} = 126-129° C.

- Acides diméthyl-3,5 hexène oïques, Eb_{14mm} = 119-120° C (145).

obtenus pour la première fois par RUPE et LOTZ (145).

Préparé par réaction de REFORMATSKY sur la méthyl-isobutyl-cétone, l'ester β-hydroxylé, Eb_{13mm} = 106-107° C, fournit, par saponification, l'acide β -hydroxylé, Eb_{13mm} = 157-159° C.

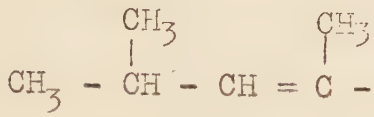
Acide diméthyl-3,5 hexène-2 oïque, Eb_{13mm} = 123° C.

$$CH_3 - \overset{\overset{CH_3}{|}}{CH} - CH_2 - \overset{\overset{CH_3}{|}}{C} = CH - COOH$$

préparé par déshydratation de l'acide β-hydroxylé correspondant au moyen d'une ébullition de 3 h. dans l'anhydride acétique.

Analyse : Calc. % pour $C_8H_{14}O_2$, C 67,52 - H 9,85
Tr. % C 67,38 H 9,87.

Acide diméthyl-3,5 hexène-3 oïque, Eb_{15mm} = 127-128° C.



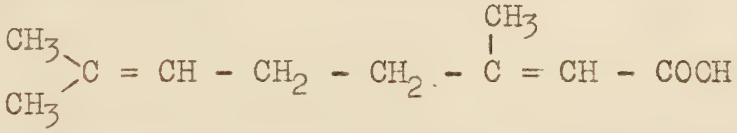
Par déshydratation de l'ester β-hydroxylé dans l'acide formique à l'ébullition, on obtient l'ester insaturé qui, par saponification dans la potasse alcoolique, fournit l'acide correspondant, Eb_{17mm} = 124-126° C (91).

Pourcentage d'isomère αβ-insaturé : 23 %

Par déshydratation de l'ester β-hydroxylé au moyen d'un chauffage à 160-180° C avec le sulfate acide de potassium pendant 3 h., suivie d'une saponification par la potasse alcoolique, on obtient l'acide βγ-insaturé contenant 15 % d'isomère αβ, Eb_{15mm} = 128-129° C.

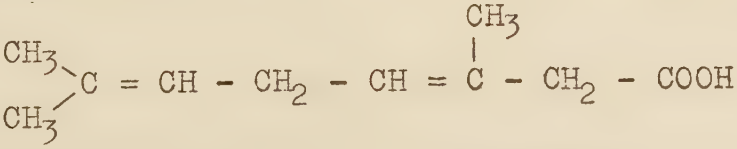
Analyse : Calc. % pour $C_8H_{14}O_2$, C 67,52 - H 9,85
Tr. % C 67,49 H 9,83.

- Acide diméthyl-3,7 octadiène-2,6 oïque, Eb_{18mm} = 157-158° C.
(ou acide géranique)



préparé suivant la méthode de DELEPINE et BONNET (45).
Le citral est oxydé par l'oxyde d'argent préparé extemporanément dans la solution en milieu alcalin.

- Acide diméthyl-3,7 octadiène-3,6 oïque, $Eb_{13-14mm}$ = 154-155° C.



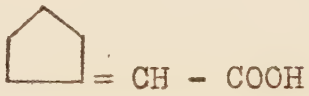
Préparé par la réaction de REFORMATSKY sur la méthyl-6 heptène-5 one-2 que l'on obtient par action de l'acétyl acétate

d'éthyle, sur le méthyl-3 butène-1 ol-3 en présence d'isopropylate d'aluminium (51).

Par la réaction de REFORMATSKY, on obtient l'ester β -hydroxylé que l'on déshydrate par chauffage à 160-180° C pendant 2 h.30 avec une partie de sulfate acide de potassium. On saponifie l'ester déshydraté par la potasse alcoolique pour obtenir l'acide, $Eb_{13-14mm}$ = 154-155° C.

Analyse : Calc. % pour $C_{10}H_{16}O_2$, C 71,23 - H 9,52
Tr. % C 70,97 H 9,34.

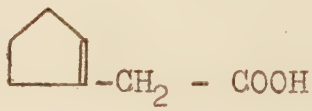
- Acide cyclopentylidène acétique, F. 63° C (178)



L'ester β -hydroxylé est saponifié par la potasse alcoolique. L'acide obtenu, F. 77° C (après cristallisation dans l'éther de pétrole) est déshydraté par ébullition pendant 3 h. dans l'anhydride acétique pour donner l'acide cyclopentylidène acétique, F. 63° C.

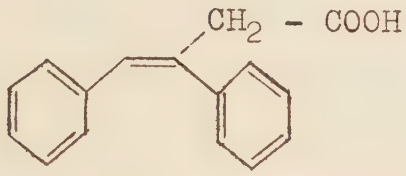
Par ébullition de 10 minutes dans la potasse à 60 %, on obtient des cristaux de fusion 51° C, dont le point de fusion n'est pas abaissé par mélange avec l'acide cyclopentène-1 acétique.

- Acide Δ^1-cyclopentène acétique, F. 51-52° C.(177).



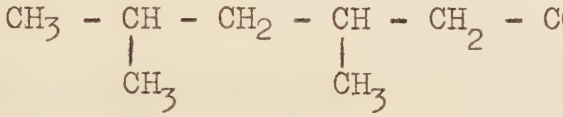
Préparé par déshydratation de l'ester hydroxylé avec 2 parties de sulfate acide de potassium pendant 3 h. à 160-180° C, puis saponification à la potasse alcoolique, F. 51-52° C.

- Acide diphényl-3,4 butène-3 oïque, F. 172-173° C.



préparé par réaction de REFORMATSKY sur la phényl-benzyl-cétone, l'acide β-hydroxylé est déshydraté par ébullition dans l'anhydride acétique.

- Acide diméthyl-3,5 hexanoïque, Eb_{14mm} = 119-120° C.



obtenu par hydrogénation catalytique sur platine ADAMS de l'acide diméthyl-3,5 hexènoïque dissous dans le méthanol (91).

Analyse : Calc. % pour $C_8H_{16}O_2$, C 66,63 - H 11,18
Tr. % C 66,42 H 10,95.

Indice d'I_2 : nul.

- Acides méthyl-5 isobutyl-3 hexènoïques.

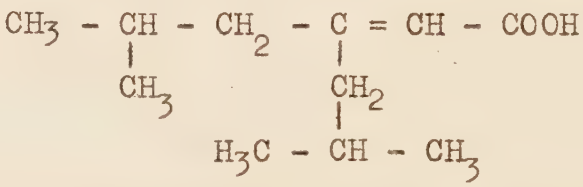
Par réaction de REFORMATSKY sur l'isovalérone (di-isobutyl-cétone), on obtient l'ester β-hydroxylé, $Eb_{0,1mm}$ = 80° C.

Préparation du méthyl-5 isobutyl-3 hydroxy-3 hexanoate d'éthyle :

Dans un ballon de 750 cm3, muni d'un réfrigérant à reflux, on dissout 28,4 g d'isovalérone et 28 cm3 de monobromacétate d'éthyle dans 150cm3 de benzène anhydre. On ajoute 16 g de zinc ; on chauffe avec une flamme légère jusqu'au commencement de l'ébullition, la réaction se poursuivant d'elle-même pendant

15 minutes. On maintient ensuite l'ébullition pendant 35 minutes. On laisse refroidir et on verse dans 500 cm3 d'acide sulfurique à 20 % glacé. On agite et décante la phase benzénique que l'on lave à l'eau jusqu'à neutralité. Après sèchage sur sulfate de sodium et évaporation du benzène, on obtient 37 g d'huile que l'on distille, $Eb_{0,1mm}$ = 80° C.

Préparation de l'acide αβ-insaturé, Eb_{10mm} = 130-131° C.



Obtenu par déshydratation au moyen de l'anhydride acétique de l'acide β-hydroxylé préparé par saponification de l'ester précédent.

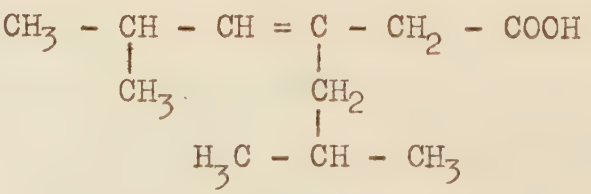
Mode opératoire :

20 g d'hydroxy-acide sont chauffés à l'ébullition à reflux avec 20 g d'anhydride acétique pendant 4 h. On distille alors l'anhydride et l'acide sous vide, Eb_{10mm} = 130-131° C.

Analyse : Calc. % pour $C_{11}H_{20}O_2$, C 71,69 - H 10,94
Tr. % C 71,48 H 11,07.

L'analyse spectrophotométrique indique la présence de 18 % de forme βγ-insaturée.

Préparation de l'acide βγ-insaturé, Eb_{10mm} = 134-136° C.



Par déshydratation de l'hydroxy-ester précédent, on obtient l'ester βγ-insaturé qui est ensuite saponifié.

La déshydratation s'effectue au moyen d'une ébullition à reflux pendant ½ h. en présence d'acide formique ou par ébullition à reflux pendant 3 h. d'une solution benzénique de l'hydroxy-ester en présence d'anhydride phosphorique. L'ester insaturé obtenu est alors saponifié suivant la méthode usuelle.

L'acide βγ-insaturé, Eb_{10mm} = 134-136° C, ne renferme que 21 % de forme αβ-insaturée dans les deux cas.

Analyse : Calc. % pour $C_{11}H_{20}O_2$, C 71,69 - H 10,94
Tr. % C 71,57 H 10,86.

2°) METHODES ANALYTIQUES.

1 - Analyse des tissus.

a) Détermination du cholestérol hépatique.

- Extraction du cholestérol.

Le dosage du cholestérol nécessite tout d'abord une extraction quantitative de cette substance des tissus. L'épuisement direct à l'éther d'un tissu, préalablement broyé, ne permet pas d'obtenir la totalité du cholestérol (77). Il faut tout d'abord déshydraté le tissu broyé au moyen d'un solvant avide d'eau, comme l'alcool ou l'acétone, puis dénaturer les protéines par coagulation afin d'obtenir la libération des lipides fixés (méthode de SHIMIDZU, 106). On peut alors effectuer une lixiviation dans un appareil d'extraction continue (type Soxhlet ou Kumagawa) au moyen d'un solvant ou d'un mélange de solvants

sélectifs des lipides, soit par l'alcool éthylique à 95° (6), soit par le mélange alcool méthylique-chloroforme (169) ou acétone (70), soit par le mélange méthylal-méthanol (46) qui permet d'obtenir en une seule opération la dénaturation des protéines et l'extraction des lipides.

Ces méthodes donnent en général une délipidation complète de la matière organique, mais elles demandent un appareillage important et elles sont longues et laborieuses (en général, il faut trois extractions de 8 h. au Kumagawa). Mais, si l'on veut doser le cholestérol libre et estérifié du tissu, il faut obligatoirement utiliser une de ces techniques ; en effet le dosage du cholestérol libre s'effectue sur la fraction lipidique ainsi extraite et le dosage du cholestérol total sur la fraction insaponifiable obtenue par saponification de ces lipides. Cette méthode laborieuse n'était pas nécessaire dans nos expérimentations puisque nous ne cherchions à déterminer que la teneur en cholestérol total du foie des rats en expérience. C'est pourquoi nous avons repris une méthode beaucoup plus simple, celle de SOBEL, KAYE et SPOERRI (155) qui a recours à une digestion du tissu par la soude et à une extraction de la matière non soluble en milieu alcalin par l'éther. On dispose ainsi d'un extrait éthéré facilement purifiable renfermant la totalité de la fraction insaponifiable du tissu et, entre autre, la totalité du cholestérol.

Pratiquement, nous avons appliqué le protocole expérimental suivant :

Le foie, fraîchement prélevé, est immédiatement pesé, découpé en morceaux, puis introduit dans 60 cm3 d'une solution hydro-

alcoolique de potasse (25 g de potasse pure dans 300 cm3 d'alcool-eau 1:1). Cette solution est portée pendant une heure à l'ébullition à reflux au bain-marie ; elle est ensuite refroidie, diluée avec deux fois son volume d'eau distillée et extraite trois fois consécutives avec 100 cm3 d'éther sulfurique sans peroxydes. Les extraits éthérés sont réunis, lavés à l'eau jusqu'à neutralité ; l'éther séché sur sulfate de sodium anhydre est alors évaporé sous vide. Le résidu ainsi obtenu est redissous dans quelques cm3 de chloroforme R.P. ; la solution chloroformique, filtrée pour éliminer l'insoluble, est alors ramenée à un volume final de 5 cm3 par évaporation ; elle renferme l'ensemble de l'insaponifiable. Le cholestérol à l'état libre peut y être dosé suivant une des méthodes colorimétrique ou pondérale décrites.

- Dosage du cholestérol.

Les méthodes colorimétriques de dosage du cholestérol utilisent :

- soit la réaction de LIEBERMANN-BURCHARD (107) qui fait apparaître avec le cholestérol une teinte verte relativement stable dont on peut apprécier l'intensité au moyen d'un photomètre (78, 117, 168, 31),
- soit la réaction de SALKOWSKI (148) qui donne une teinte rouge et qui permet ainsi le dosage colorimétrique (180).

Les méthodes pondérales les plus utilisées dérivent toutes de celle mise au point par WINDAUS (182) qui consiste à précipiter le cholestérol libre sous forme de complexe avec la digito-

nine et à peser le précipité ainsi obtenu (121, 30, 68). Une seule modification intéressante est à signaler, celle de DELSAL (47) qui utilise la natigine à la place de la digitonine, ce qui permet de faire un dosage colorimétrique directement sur le complexe cholestérol-natigine, sans libérer le cholestérol après précipitation, évitant ainsi les erreurs de pesée sur des quantités très faibles.

Nous avons, au cours de nos recherches, utilisé pour les mesures de routine la technique colorimétrique de MACHEBOEUF et DELSAL (117) basée sur la réaction de LIEBERMANN-BURCHARD.

On prélève dans un tube à essai très sec 0,3 cm3 de la solution chloroformique renfermant le cholestérol extrait du foie. On ajuste le volume à 5 cm3 avec du chloroforme R.P. ; on ajoute ensuite 2 cm3 d'anhydride acétique R.P. (*). A un instant déterminé, on ajoute 5 gouttes d'acide sulfurique concentré ; on agite et on place le tube dans un bain-marie maintenu à 37° C pendant 10 minutes exactement, temps au bout duquel la coloration obtenue est maximum. On effectue alors la mesure de l'intensité de coloration au moyen d'un électrophotomètre de P. MEUNIER en utilisant l'écran 65 et le diaphragme 10. Le chiffre lu fournit en se rapportant à la courbe d'étalonnage (35) la concentration en cholestérol de la solution à analyser.

(*) Remarque : La pureté de l'anhydride acétique a une très grande importance car la présence de traces d'acide acétique dans ce réactif entraîne une variation importante de l'intensité de la couleur obtenue.

Etalonnage de l'appareil :

Au moyen d'une solution chloroformique de cholestérol contenant 60 mg de cholestérol dans 100 cm3 de chloroforme, on prépare 4 tubes contenant respectivement : 60 µg (0,1 cm3) - 180 µg (0,3 cm3) - 300 µg (0,5 cm3) et 420 µg (0,7 cm3) de cholestérol. On complète chaque tube à 5 cm3 avec du chloroforme et on ajoute 2 cm3 d'anhydride acétique. On porte au bain-marie à 37° C pendant quelques minutes puis on ajoute, de minute en minute, 5 gouttes d'acide sulfurique concentré dans chaque tube. On agite et laisse à 37° C pendant 10 minutes exactement. Les lectures d'intensité de coloration sont faites avec l'écran 65 et le diaphragme 10 de l'électrophotomètre de P. MEUNIER, ce qui permet de construire la courbe d'étalonnage qui est en général une droite.

b) Détermination des acides gras hépatiques.

- Extraction.

L'étude de la fraction acides gras du tissu hépatique pouvait nous fournir quelques renseignements sur le mode d'action des substances étudiées ; c'est pourquoi nous avons entrepris l'extraction des acides gras contenus, sous forme de savons de potassium, dans la phase aqueuse ou saponifiable précédemment obtenue.

Les eaux-mères alcalines d'extraction de l'insaponifiable, ainsi que les premières eaux de lavage de la phase éthérée, sont réunies, acidifiées jusqu'à pH 1 par l'acide chlorhydrique. Les acides gras ainsi libérés sont alors extraits trois fois

consécutives avec de l'éther sulfurique sans peroxydes. La phase éthérée est lavée soigneusement à l'eau jusqu'à neutralité, en évitant les agitations trop violentes qui entraînent la formation d'une émulsion. L'extrait éthéré, séché sur sulfate de sodium anhydre, est évaporé à sec et le résidu ainsi obtenu est repris par du chloroforme R.P. à chaud. On laisse refroidir cette solution puis on la filtre pour éliminer les substances non solubles dans le chloroforme. Cette solution chloroformique transvasée dans une fiole de FOURNEAU tarée est évaporée à 50° C sous courant d'azote pour éviter les oxydations. On dessèche ensuite jusqu'à poids constant dans un dessiccateur sous vide en présence de P_2O_5 et on en déduit le poids total des acides gras extraits du tissu hépatique.

- Mesure de l'indice d'iode.

Le degré d'insaturation des acides gras ainsi séparés pouvait nous apporter une indication sur les modifications du métabolisme des graisses (32) que peuvent engendrer les composés hypocholestérolémiants. C'est pourquoi nous avons effectué la détermination de l'indice d'iode de ces acides gras. L'indice d'iode est défini comme le nombre de grammes d'iode fixé par 100 g de lipides. Il est directement proportionnel au nombre de doubles liaisons éthyléniques présentes dans la molécule d'acide gras étudiée.

Les différents procédés classiques de détermination de l'indice d'iode ont été proposés par HÜBL, WYS et HANUS (88, 186, 80), entre 1884 et 1901 et ce sont encore ces différentes

techniques qui sont utilisées de nos jours sans modifications notables.

Dans la technique de HÜBL (88), une solution de lipides dans le chloroforme est mélangée avec une solution d'iode et de chlorure de mercure dans l'éthanol ; le mélange est laissé au repos à l'obscurité pendant deux heures ; on ajoute un iodure et l'iode libéré est titré par le thiosulfate en présence d'empois d'amidon.

WYS (186) a modifié cette technique de la façon suivante : une solution de lipides dans le chloroforme ou le tétrachlorure de carbone est mélangée avec une solution d'iode et une quantité équivalente de chlore dans l'acide acétique glacial ; le mélange est laissé 10 minutes à l'obscurité ; on ajoute de l'iodure et l'iode libéré est titré par le thiosulfate en présence d'empois d'amidon.

La méthode de HANUS (80) est sensiblement la même que celle de WYS ; seule la solution d'iode contient du brome à la place du chlore.

Chacune de ces méthodes fournit les mêmes indices d'iode théoriques pour les acides gras insaturés étalons. Seul l'indice d'iode obtenu par la méthode de HANUS est de 2 à 4 % plus faible que celui trouvé par la technique de WYS ; cette dernière est d'ailleurs la méthode officielle de l'American Oil Chemist's Society.

D'autres techniques proposées par WINKLER et KAUFMAN n'apportent que des modifications de détails.

Pour nos déterminations de l'indice d'iode des acides gras hépatiques, nous avons utilisé la méthode de WYS (186), avec le protocole expérimental suivant :

Réactif de WYS :

Dissoudre par chauffage, à l'abri de l'humidité, 9,4 g de trichlorure d'iode dans 200 cm3 d'acide acétique. Ajouter alors 7 g d'iode dissous à chaud dans 400 cm3 d'acide acétique. Mélanger les deux solutions et compléter à 1000 cm3 avec de l'acide acétique glacial.

Mode opératoire :

Dissoudre p mg (en général 300 mg) d'acides gras ou de graisses dans 10 cm3 de chloroforme. Prélever, dans un erlen bouché, 2 cm3 de cette solution et lui ajouter exactement 5 cm3 de la solution de WYS.

Faire un essai témoin en mélangeant, dans un erlen bouché, 2 cm3 de chloroforme et 5 cm3 de la solution de WYS. Laisser 2 h. à l'abri de la lumière. Ajouter alors dans chacun des erlens 2 cm3 d'une solution d'iodure de potassium à 10 %, puis 50 cm3 d'eau distillée.

Titrer l'excès d'iode par de l'hyposulfite 0,1 N, en présence d'empois d'amidon comme indicateur en fin de titrage.

Soit n la différence en cm3 entre la quantité d'hyposulfite utilisée dans l'essai à blanc et la quantité utilisée pour la mesure, on aura l'indice d'iode qui est le poids d'iode en g fixé par 100 g de substance, au moyen de la formule :

$$\text{indice d'iode} = \frac{n \times 1270}{p \text{ mg}}$$

c) Validité des techniques proposées pour la détermination du cholestérol et des acides gras hépatiques.

Nous avons vérifié au moyen d'une méthode de référence (55) que les résultats obtenus par la technique simplifiée envisagée pour notre travail étaient valables et que la limite d'erreur ne dépassait pas $\pm$ 3 %.

- Méthode de référence.

α) Extraction des lipides totaux.

La matière première est finement broyée en présence de 5 volumes d'alcool ; l'ensemble est ensuite porté à l'ébullition durant 10 minutes pour coaguler les protéines. La fraction insoluble est alors transvasée quantitativement dans un appareil de Kumagawa où elle est soumise à une extraction continue à l'alcool éthylique pendant 8 h. Puis l'extraction est poursuivie, à nouveau pendant 8 h., au moyen d'éther et, finalement, avec du benzène en ayant au préalable pris soin de retirer du ballon d'extraction toute trace des extraits précédents. L'extrait benzénique obtenu au bout de 8 h. est évaporé à sec, ceci pour vérifier l'efficacité de l'extraction qui doit être poursuivie si le benzène a encore dissous des lipides. Les différents extraits, y compris l'alcool qui a servi à coaguler les protéines, sont réunis et évaporés à sec sous vide. L'extrait ainsi obtenu est utilisé pour le dosage du cholestérol libre et, après saponification, pour le dosage du cholestérol total et des acides gras.

β) Dosage du cholestérol libre.

Nous avons employé la méthode pondérale de CAMINADE (30) qui utilise la précipitation du cholestérol libre par le digitonoside.

Réactifs : Solvant de CAMINADE : Acétone 73 volumes
Eau 18 volumes
Alcool absolu 9 volumes

Solution de digitonoside à 0,5 % dans le solvant de CAMINADE.

Technique :

L'échantillon de lipides totaux qui doit renfermer de 2 à 3 mg de cholestérol libre est posé dans un petit bécher puis dissous dans 15 à 20 cm3 de solvant de CAMINADE. On y ajoute 2,5 cm3 de la solution de digitonoside et on laisse déposer le précipité pendant quelques minutes. Après avoir vérifié que l'on a un excès de digitonoside, on transvase quantitativement la solution sur un petit filtre en verre fritté préalablement taré. On lave le bécher à l'eau bouillante et on entraîne tout ce qui reste du précipité sur le filtre. On déshydrate le précipité et le filtre en les rinçant avec du solvant de CAMINADE, puis on les lave avec de l'éther jusqu'à ce que le liquide qui s'écoule ne soit plus coloré. Après évaporation de l'éther, on dessèche pendant 30 minutes dans une étuve à 110° C. On pèse : le poids du précipité multiplié par 0,243 donne le poids de cholestérol libre contenu dans la prise d'essai.

γ) Dosage du cholestérol total et des acides gras.

Le dosage du cholestérol total ne peut pas être effectué sur l'extrait lipidique brut car certaines substances autres que le cholestérol interfèrent sur la réaction colorimétrique

de LIEBERMANN-BURCHARD. Il est donc nécessaire de saponifier la matière grasse pour en séparer l'insaponifiable et les acides gras.

Saponification:

La substance à saponifier, pesée dans un petit ballon, est mélangée avec 40 fois son poids de potasse alcoolique à 5 % (préparée en dissolvant la potasse dans le minimum d'eau puis en complétant le volume avec de l'alcool à 96°). On chauffe à reflux pendant 2 h.

Extraction de l'insaponifiable :

Le mélange homogène obtenu est transvasé dans une ampoule à décanter ; on ajoute un volume d'éther de pétrole ; après agitation, on dilue lentement avec de l'eau pour obtenir la séparation de la phase organique. La phase aqueuse est encore extraite deux fois avec l'éther de pétrole. Les solutions éthéro-pétroliques sont réunies et lavées avec de petites quantités d'eau jusqu'à neutralité (les premières eaux de lavage sont jointes à la phase aqueuse). La phase éthérée est alors évaporée à sec sous vide. Cette fraction constitue l'insaponifiable sur lequel on effectue le dosage du cholestérol total par la méthode de LIEBERMANN-BURCHARD (107), décrite p. 28.

Extraction des acides gras :

La phase aqueuse précédemment obtenue est acidifiée par l'acide chlorhydrique et les acides gras extraits par trois agitations successives avec l'éther sulfurique. Les solutions éthérées réunies sont lavées à l'eau jusqu'à neutralité puis évaporées sous vide. On redissout alors le résidu dans le chloroforme et on transvase quantitativement cette solution, après

filtration, dans une fiole tarée. Le solvant est chassé par un courant d'azote et on dessèche alors à poids constant dans un dessiccateur sous vide en présence d'anhydride phosphorique. Cette fraction est constituée par les acides gras.

- Validité de la technique simplifiée utilisée dans ce travail.

Nous avons sacrifié 4 rats par décapitation ; les foies de chacun de ces animaux ont été broyés pour bien homogénéiser l'ensemble. Deux parties aliquotes de chacun de ces broyats ont été prélevées et soumises à un dosage du cholestérol et des acides gras par les deux méthodes. Nous avons obtenu les résultats suivants :

- Cholestérol total du foie :

	Foie 1	Foie 2	Foie 3	Foie 4
Méthode de référence	0,280%	0,252%	0,310%	0,230%
Technique simplifiée	0,275%	0,260%	0,300%	0,235%

En considérant le dernier chiffre comme non significatif, nous obtenons les valeurs moyennes ci-dessous :

Méthode de référence : 0,27 %

Méthode simplifiée : 0,27 %

- Acides gras totaux du foie :

	Foie 1	Foie 2	Foie 3	Foie 4
Méthode de référence	2,80 %	3,20 %	3,10 %	2,70 %
Technique simplifiée	2,60 %	3,00 %	3,10 %	2,80 %

Moyennes : Méthode de référence : 2,95 %

Méthode simplifiée : 2,88 %

(erreur inférieure à 3 %).

2 - Détermination du cholestérol sérique.

a) Dosage du cholestérol total.

La question du dosage sélectif du cholestérol du sérum n'est pas encore entièrement résolue, si l'on en juge par le très grand nombre de publications sur ce sujet.

Toutes les techniques décrites permettent le dosage de la totalité de la fraction lipidique réagissant avec les réactifs des stérols. Pratiquement, la plupart de ces méthodes utilisent la même détermination colorimétrique du cholestérol au moyen de la réaction de LIEBERMANN-BURCHARD ; les différences fondamentales se trouvent dans le mode d'extraction du cholestérol. Il est en effet nécessaire, pour effectuer ce dosage, d'extraire tout d'abord le cholestérol du sérum où il se trouve plus ou moins lié à la fraction protéique.

BLOOR (21) et VELLUZ (174) emploient comme solvant d'extraction le mélange alcool-éther dans la proportion de 3 à 1 ; 20 à 30 volumes de ce mélange sont ajoutés à 1 volume de sérum ; cette solution est portée à l'ébullition pendant 5 minutes environ, ce qui dénature les protéines et libère l'intégralité du cholestérol.

BOYD (24) remarqua que cette ébullition n'était pas nécessaire et , qu'à la température ordinaire, l'extraction était pratiquement totale, à condition de prolonger le contact du mélange extractif avec le sérum suffisamment longtemps.

GRIGAUT (79) utilise de préférence l'alcool sodé (1 % de soude dans l'alcool à 60° C), dans la proportion de 10 volumes d'alcool sodé pour 1 volume de sérum ; l'extraction et la saponification du cholestérol sont complètes après 15 minutes au bain-marie bouillant.

DELSAL (46) montra que la saponification des esters du cholestérol n'était pas nécessaire pour obtenir un dosage correct par la méthode colorimétrique basée sur la réaction de LIEBERMANN-BURCHARD, à condition d'effectuer cette réaction dans des conditions particulières. Il proposa d'extraire le cholestérol libre et estérifié par le mélange méthylal-méthanol (4:1), en utilisant environ 30 volumes de mélange pour 1 volume de sérum et de déterminer directement le cholestérol sur cette solution.

La méthode de KRIEGER (103) que nous avons utilisée dans notre travail dérive de ces différentes techniques ; elle consiste à dénaturer les protéines par l'alcool sodé qui libère en outre les lipides liés et à extraire le cholestérol par l'éther. Cette technique présente l'avantage de s'appliquer à des quantités très faibles de sérum, de n'utiliser que des volumes réduits d'éther et d'être relativement rapide. Toutefois, elle présente, comme d'ailleurs les autres techniques, l'inconvénient de baser le dosage colorimétrique sur la réaction de LIEBERMANN qui n'est pas entièrement spécifique du cholestérol.

Technique (35) :

Après coagulation et formation du caillot (ce qui demande environ 1 à 2 h. à la température ordinaire), le sang est centrifugé pendant 5 minutes environ ; le sérum surnageant est séparé puis conservé à la glacière à + 4° C, lorsque le dosage n'est pas pratiqué immédiatement.

Extraction :

On prélève 0,25 cm3 de sérum que l'on introduit dans une petite ampoule à décanter de 25 cm3. On ajoute alors, en mé-

langeant soigneusement :

1,75 cm3 d'eau distillée,

6 cm3 d'alcool sodé de composition :
- lessive de soude à 36° B 1,25 cm3
- alcool à 96° 62 cm3
- eau distillée, q.s.p. 100 cm3

10 cm3 d'éther pur.

On agite ce mélange et laisse reposer quelques minutes. On décante la partie inférieure, lave deux fois avec 10 cm3 d'eau distillée en agitant doucement pour éviter les émulsions. L'éther est alors recueilli, l'ampoule rincée avec quelques centimètres cubes d'éther qui sont joints à l'extrait éthéré. L'éther est évaporé à sec et séché sous vide jusqu'à dessiccation parfaite. Le résidu est repris par 5 cm3 de chloroforme R.P. et la solution est amenée à la température de 37° C au bain-marie.

Dosage :

On introduit dans les 5 cm3 de solution chloroformique précédente 2 cm3 d'anhydride acétique R.P. et 5 gouttes d'acide sulfurique concentré. On laisse reposer le tube à essai contenant ce mélange pendant 10 minutes à 37° C, après l'avoir soigneusement agité. On effectue alors la lecture de l'intensité de coloration à l'électrophotomètre de P. MEUNIER, en utilisant l'écran 65 et le diaphragme 10. En se rapportant à la courbe d'étalonnage, on déduit la concentration en cholestérol des 0,25 cm3 de sérum.

b) Dosage du cholestérol libre et estérifié.

Le dosage du cholestérol libre et estérifié peut être effectué selon la méthode de SCHOENHEIMER et SPERRY (150, 157) ; mais, pour être applicable, cette technique demande des quantités importantes de sérum car elle comporte la précipitation du cholestérol libre

sous forme de complexe avec le digitonoside ; de plus, elle est très longue et, même avec la modification proposée par SOBEL et MAYER (156), le dosage ne peut s'effectuer qu'après un très long laps de temps, nécessaire pour la précipitation totale du complexe.

C'est finalement la technique de DELSAL (47), applicable sur 2 cm3 de sérum, que nous avons utilisée lors de nos recherches. Dans ce microdosage, le cholestérol libre, après extraction du sérum par un solvant approprié, est précipité par la natigine. On effectue alors sur le complexe cholestérol-natigine, isolé par centrifugation, la réaction de LIEBERMANN-BURCHARD, ce qui donne la quantité de cholestérol libre précipité.

Technique.

- Extraction du cholestérol total du sérum (46) :

On mélange dans un tube à essai 2 cm3 de sérum et 4 cm3 du mélange méthylal-alcool méthylique (20%) ; on agite bien, centrifuge. Le liquide supérieur est soigneusement décanté et conservé. On effectue alors 3 lavages du culot de centrifugation avec 4 cm3 du mélange méthylal-méthanol, en recueillant chaque fois les liquides de lavages. Ces solutions sont alors mélangées et évaporées sous vide à une température inférieure à 40° C. Le résidu est repris dans le chloroforme ; la solution chloroformique filtrée est amenée à un volume final de 10 cm3.

- Dosage du cholestérol libre :

On prélève 5 cm3 de solution lipidique chloroformique correspondant à 1 cm3 de sérum que l'on met dans un tube à centrifuger cônique de 15 cm3. On évapore le chloroforme sous azote jusqu'à un volume final de 0,1 à 0,2 cm3. On ajoute alors 3 cm3

de solution saturée de natigine dans l'alcool à 80°. On agite soigneusement avec un agitateur effilé, puis abandonne au repos pendant 1 h.30. On centrifuge le précipité formé et décante la solution. On lave 3 fois, avec l'éther anhydre, le complexe qui adhère à la paroi du tube. On ajoute aussitôt 6 cm3 d'anhydride acétique et 1 cm3 de chloroforme et met le précipité en suspension avec l'agitateur. Le précipité se dissout immédiatement lorsqu'on ajoute 3 gouttes d'acide sulfurique. On laisse alors le tube au repos pendant 30 minutes à la température ordinaire 18-20° C. On mesure l'intensité de la coloration au photomètre P. MEUNIER, écran rouge (n° 64), ce qui fournit la concentration en cholestérol, en se rapportant à une courbe étalon obtenue en opérant comme précédemment sur des précipités par la natigine de quantités de cholestérol variant de 50 à 300 µg.

3°) MATERIEL BIOLOGIQUE.

1 - Animaux et Aliments utilisés.

Nous avons utilisé dans nos expériences des rats blancs, de race Wistar, provenant de l'élevage de G. DUPONT à Mézériat (Ain) ; ces animaux sont âgés de :

- 35 à 40 jours (poids variant de 50 à 70 g),
- 100 à 120 jours (poids variant de 210 à 250 g).

Ils sont répartis en lots homogènes de 15 et mis au régime normal standard pendant une période d'observation de 5 jours, ce qui permet d'éliminer les animaux déficients ou malades. Après ce laps de temps, ils reçoivent ad libitum de l'eau et un régime de composition suivante :

Régime à 10 % de saindoux.

Farine de maïs	180
Farine d'orge	225
Farine de viande	90
Farine de luzerne	90
Levure de bière	18
Tourteau d'arachide	45
Remoulage	117
Farine de poissons	90
Saindoux	100
Condiment porcelet SARB (condiment minéral vitaminé)	45

Ce régime est équilibré au point de vue calorique et protéinique ; sa teneur en acides aminés indispensables qui sera discutée p. 176 est suffisante pour permettre une croissance normale des jeunes animaux. Seule existe une légère augmentation de la valeur calorifique de ce régime par suite de l'introduction de graisses dans sa composition.

Voici maintenant la composition du régime normal standard qui a parfois été utilisé pendant toute la durée de certaines expériences :

Régime normal standard.

Farine de maïs	180
Farine d'orge	225
Farine de viande	90
Farine de luzerne	90
Levure de bière	18
Tourteau d'arachide	45
Remoulage	117
Farine de poissons	90
Amidon	100
Condiment porcelet SARB	45

La teneur en protéines de ce régime est comparable à celle du précédent ; seule sa valeur calorifique est légèrement inférieure du fait du remplacement des lipides par des glucides. Il permet cependant une croissance comparable à celle obtenue avec les régimes standards du commerce : Aliments "J.M." spé-

ciaux pour animaux de laboratoire (VERRE & TECHNIQUE - 57, rue des Plantes, Paris XIV^{ème}).

Les éléments minéraux ainsi que les vitamines hydrosolubles et liposolubles sont apportés par le condiment porcelet SARB ; les teneurs en vitamines de ces régimes sont les suivantes :

Vitamine A	6.000	U.I. / Kg
Vitamine D	3.500	U.I.
Vitamine B_1	6	mg
Vitamine B_2	15	mg
Vitamine PP	55	mg
Acide pantothénique	30	mg
Vitamine B_6	1,50	mg
Vitamine B_{12}	6	µg
Vitamine E	15	mg
Choline	900	mg

La température de la pièce qui oscille entre 19 et 21° C, ainsi que son éclairage, sont identiques pour chacun des groupes.

Les animaux sont pesés régulièrement au début de chaque semaine, ce qui permet de déterminer leur courbe de poids et de déceler éventuellement une modification de leur croissance due soit à une diminution de leur consommation alimentaire, soit à une action toxique possible des substances administrées.

Les produits à tester sont distribués tous les jours per os, au moyen d'une pipette dont les gouttes sont étalonnées.

A la fin de l'expérimentation, les animaux sont sacrifiés par décapitation, après un jeûne de 10 h. Le sang est recueilli dans des tubes à centrifuger. On prélève ensuite rapidement le foie qui est découpé pour être mis dans un volume déterminé d'une solution hydro-alcoolique de potasse qui sert pour la saponification. L'autopsie de l'animal est effectuée en même temps, afin d'éliminer les animaux malades qui pourraient fausser les résultats.

2 - Cholestérolémie moyenne.

Il était aussi nécessaire de déterminer au préalable la teneur moyenne en cholestérol du sang des animaux que nous voulions utiliser, teneur différente selon les souches comme le montre le tableau ci-dessous, dû à H.I. KOHN (96).

Cholestérolémie du rat adulte

(régime normal)

Souche	Cholestérolémie	nombre de rats utilisés
Tumblebrook-Hooded	68,5 ± 3,3 mg %	20
Sprague-Dawley	120 ± 6,0 mg %	39
Holtzman	65,3 ± 2,8 mg %	16
Osborne-Mendel	132 ± 4,0 mg %	10

C'est ainsi que nous avons trouvé les valeurs moyennes suivantes sur 60 rats âgés de 35 à 42 jours au début de l'expérience et maintenus au régime suivant :

Régime à 10 % de saindoux :

pendant 30 jours : 81 ± 2 mg % (60 rats)

pendant 40 jours : 88 ± 3 mg % (60 rats)

Régime standard normal :

pendant 30 jours : 79 ± 2 mg % (60 rats).

Ces résultats concordent avec ceux de D. BARGETON et Collaborateurs (9) qui ont constaté sur une souche de rats blancs (élevage Rhône-Poulenc), maintenus à un régime normal et âgés de 50 à 60 jours, une cholestérolémie de : 80 ± 2 mg %.

III/ - DEUXIEME PARTIE :

RECHERCHES DE COMPOSES HYPOCHOLESTEROLEMIANTS.

1°) Mise au point du protocole d'expérimentation biologique.

L'expérimentation animale des composés hypocholestérolémiants pose un certain nombre de problèmes pratiques. On sait en effet que la cholestérolémie, très stable chez le rat, est cependant influencée par le régime alimentaire. La technique consistant à introduire dans la nourriture une quantité assez importante de cholestérol (de 1 à 3 %) entraîne rapidement une hypercholestérolémie moyenne chez le rat, mais le cholestérol a une origine exogène et, dans ce cas, seules les substances bloquant son absorption intestinale ou augmentant son excrétion biliaire ou intestinale peuvent agir sur ce phénomène. Pour concevoir un protocole expérimental valable, il fallait donc envisager les différents facteurs pouvant intervenir dans la vitesse de biosynthèse du cholestérol.

1 - Variations physiologiques de la biosynthèse du cholestérol.

a) Lieu et vitesse.

Il était tout d'abord nécessaire de connaître les lieux de synthèse de la molécule de cholestérol, ainsi que sa vitesse de renouvellement dans l'organisme.

L'étude de la localisation de la synthèse du cholestérol a été entreprise par différents auteurs en utilisant la technique *in vitro* de mesure du pourcentage d'incorporation de l'acétate de sodium radioactif (1-^{14}C) dans le cholestérol par des coupes d'organes maintenus en survie dans un tampon physiologique, en général phosphaté (15, 154, 135, 175). Ainsi, il a été mis en évidence que les organes suivants : foie, peau, intestin, rein, testicules, surrénales, ovaires, étaient capables de synthétiser

la molécule de cholestérol. Cependant, le foie joue dans cette synthèse un rôle prépondérant. La peau présente elle aussi une activité assez intense. Il est d'autre part à remarquer que le cerveau du jeune rat peut synthétiser le cholestérol, alors que, chez le rat adulte, cette synthèse est pratiquement inexistante (154).

A la suite de ces résultats obtenus in vitro, il était aussi nécessaire d'effectuer la mesure de la vitesse absolue de synthèse du cholestérol in vivo. La première mesure de cette vitesse de synthèse chez l'animal vivant a été faite par K. BLOCH et ses Collaborateurs (134), qui ont étudié les variations des concentrations isotopiques dans le cholestérol total de l'organisme, après administration d'acétate de sodium radioactif (1-^{14}C) chez le rat adulte. Ces auteurs ont trouvé une durée de demi-vie de 6 jours pour le cholestérol hépatique et de 31 à 32 jours pour tout le cholestérol des autres organes, sauf le cerveau.

D'autres auteurs ont repris ces expériences avec d'autres techniques, utilisant soit le deutérium, soit le ^{14}C comme atome marqué (93, 10) ; leurs résultats sont assez proches de ceux fournis par l'expérience de K. BLOCH. Ce sont LONDON et RITTENBERG (109) qui ont étudié cette vitesse de synthèse chez l'homme ; en mesurant la variation de la concentration isotopique en deutérium du cholestérol sanguin en fonction du temps, chez un homme ayant ingéré de l'eau lourde, ils ont ainsi déterminé la durée de demi-vie du cholestérol circulant et l'ont trouvée égale à huit jours.

Toutes ces expériences sont évidemment sujettes à critiques ; mais ces chiffres indiquent bien la réalité du processus

de biosynthèse du cholestérol dans l'organisme animal.

b) Influence de l'âge sur la vitesse de biosynthèse du cholestérol.

Il faut aussi signaler que, chez le rat, l'importance de la synthèse est fonction de l'âge de l'animal, la synthèse étant beaucoup plus intense pendant la période de croissance (17). On observe en outre, au cours de la croissance, une baisse progressive du cholestérol sérique qui passe de 80 mg pour 100 cm3 à 58 mg pour 100 cm3 de la sixième à la onzième semaine et remonte ensuite pour se stabiliser finalement à une valeur de l'ordre de 75 mg pour 100 cm3 à la quarantième semaine (9). Dans ces conditions, nous avions intérêt à utiliser de jeunes animaux chez qui la synthèse du cholestérol est très active et où une inhibition légère de ce processus pendant une période assez courte devait certainement se traduire par une baisse importante de la concentration en cholestérol de l'organisme animal.

La cholestérolémie qui est fonction chez les individus sains de la teneur en cholestérol des tissus irrigués par le sang permettra de concrétiser ce phénomène. Le dosage de la teneur en cholestérol du tissu hépatique apportera une idée de l'intensité de l'inhibition de la synthèse tissulaire. Nous avons vérifié expérimentalement cette différence de comportement des rats jeunes et des rats adultes.

Les animaux reçoivent, dans les deux groupes d'expérience, la même nourriture artificiellement enrichie en graisse animale, suivant le protocole expérimental déjà décrit (régime à 10 % de saindoux). Nous avons utilisé d'une part 30 rats en voie de croissance, de poids moyen 60 g au début de l'expérimentation, et, d'autre part,

30 rats adultes, de poids moyen 230 g au début de l'expérience.

Chacun de ces lots est divisé en deux groupes homogènes de 15 rats, le premier groupe servant de témoin pour le lot correspondant. Les animaux des deux autres groupes reçoivent, per os, de l'acide méthyl-3 pentène-3 oïque en solution bicarbonatée, à la dose de 300 mg par Kg de poids. Au bout d'un mois de traitement, les animaux sont sacrifiés ; le dosage du cholestérol sérique est effectué sur les différents groupes.

Les résultats ont été consignés dans le tableau ci-après :

Tableau 1 - Influence de l'âge sur l'effet hypocholestérolémiant de l'acide méthyl-3 pentène-3 oïque.

Rats de 60 g au début de l'expérience(*)		Rats de 230 g au début de l'expérience	
Cholestérol sanguin		Cholestérol sanguin	
Témoins	Traités (300 mg/Kg/j)	Témoins	Traités (300 mg/Kg/j)
74 mg %	67 mg %	72 mg %	68 mg %
80	57	78	72
87	62	69	74
80	66	71	67
78	69	75	65
72	80	74	69
84	65	76	73
65	82	75	68
78	67	74	71
90	65	78	65
84	72	68	71
74	67	76	69
77	63	73	67
78	70	70	65
68	69	77	70
moyenne : 78 mg % $\pm$ 3	68 mg % $\pm$ 3	74 mg % $\pm$ 2	69 mg % $\pm$ 2

(*) Croissance analogue des groupes témoin et traité (poids moyen en fin d'expérimentation : 140 g).

Pour résumer ces résultats et en tenant compte des limites statistiquement probables des valeurs de la cholestérolémie, les chiffres suivants peuvent être retenus comme valables pour les 4 groupes d'animaux :

	Animaux en voie de croissance	Animaux adultes
Témoins :	75 mg% < 78 mg% < 81 mg%	72 mg% < 74 mg% < 76 mg%
Traités :	65 mg% < 68 mg% < 71 mg%	67 mg% < 69 mg% < 71 mg%

Le rapprochement de ces chiffres montre immédiatement que la réponse obtenue chez les jeunes animaux est beaucoup plus intense que chez les animaux adultes, dans les mêmes conditions. Ce phénomène est la conséquence de la différence existant dans les vitesses de métabolisme chez un organisme en voie d'évolution rapide et un organisme ayant atteint son équilibre physiologique. Comme preuve de cette hypothèse, nous pouvons apporter les expériences in vitro sur des coupes d'organes jeunes, par BLOCH et RITTENBERG (17), ainsi que la grande différence entre la durée de demi-vie du cholestérol chez le jeune rat et chez le rat adulte. Nous-mêmes, en poursuivant l'expérience ci-dessus durant une période de 3 mois avec les rats adultes, avons observé une hypocholestérolémie très intense chez les animaux recevant de l'acide méthyl-3 pentène-3 oïque ; la différence entre la cholestérolémie des animaux témoins et celle des traités se rapproche alors de celle observée avec de jeunes animaux au bout d'un mois.

Au cours de cette expérience, la consommation alimentaire des animaux, contrôlée sur une période de 3 mois, est identique pour les deux groupes. Il en est de même pour la prise de poids des animaux traités et des animaux témoins.

Au début de l'expérimentation, le poids moyen des rats est de 230 g environ ; il atteint 290 g en fin d'expérience.

Tableau 2 - Action hypocholestérolémiante sur des rats adultes de l'acide méthyl-3 pentène-3 oïque.

cholestérol sanguin	
Témoins	Traités (300 mg/kg:j)
78 mg %	65 mg %
75	67
79	66
80	72
76	64
81	68
84	70
83	74
86	65
78	64
moyenne :	
80 $\pm$ 3 mg%	68 $\pm$ 3 mg%

Témoins : 77 mg % < 80 mg % < 83 mg %

Traités : 65 mg % < 68 mg % < 71 mg %

A la suite de ces essais, nous voyons l'énorme importance de l'âge des animaux sur leur métabolisme lipidique ; en ne tenant compte que de la valeur moyenne, on constate un abaissement de la cholestérolémie de 13 % au bout d'1 mois chez des animaux jeunes et de 7 % seulement chez des animaux adultes. Il faut, chez ces

derniers, poursuivre l'administration d'hypocholestérolémiant pendant une période de 3 mois pour obtenir une chute de la cholestérolémie de 14 % correspondant à celle observée au bout d'un mois chez les jeunes animaux.

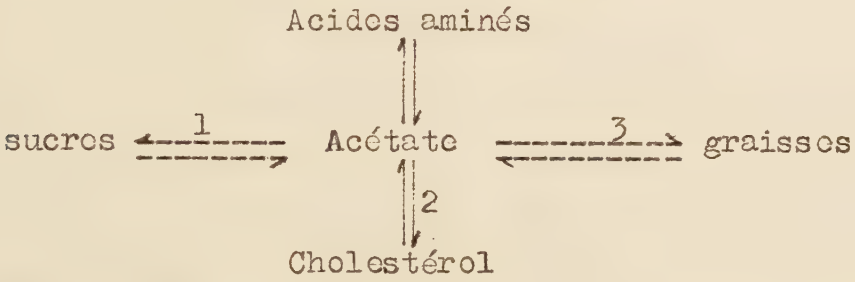
c) Influence des facteurs nutritionnels.

Nous devons aussi tenir compte des facteurs nutritionnels et endocriniens. La diète hydrique réduit fortement la vitesse de synthèse du cholestérol. Chez le rat laissé à jeun, l'incorporation *in vitro* de l'acétate radioactif dans le cholestérol par les coupes de foie est fortement diminuée (173). Cette diminution de l'activité synthétique serait de l'ordre de 40 % chez le rat soumis à un jeûne de 120 h.; cependant, la masse du cholestérol de l'organisme demeure inchangée ; il est à remarquer que cette activité peut être également réduite par une restriction alimentaire, même partielle (170). C'est pourquoi, dans les expériences décrites, nous avons comparé, la plupart du temps, la consommation alimentaire des animaux traités à celle des témoins.

Lorsque l'on donne, par sonde gastrique, soit des hydrates de carbone (saccharose, glucose), soit des graisses (huile de coco, huile de maïs), à des rats soumis au préalable à la diète, on ramène à la normale le pouvoir de biosynthèse du cholestérol par le foie (82, 4), ce qui semble indiquer qu'au cours du jeûne, l'acide acétique est surtout utilisé pour la synthèse de substances fortement énergétiques comme les sucres et les graisses, alors que la synthèse du cholestérol qui est moins nécessaire pendant un cours laps de temps, puisque la vie moyenne du cholestérol de l'organisme est assez grande, est abandon-

néo. Ceci impliquerait soit une régulation endocrinienne qui ne semble pas être démontrée d'une manière certaine par d'autres expériences, soit une régulation automatique par simple déplacement d'équilibre des réactions métaboliques dans le foie.

On peut représenter le champ métabolique de l'acide acétique par le schéma suivant où chacune des transformations envisagées s'effectue par une succession de réactions équilibrées :



Si les concentrations en sucres et en graisses viennent à diminuer fortement dans le foie par suite du jeûne, alors que la concentration en cholestérol varie peu, ce sont les réactions 1 et 3 qui sont amplifiées au détriment de la réaction 2. Inversement, si un excès de sucres ou de graisses est apporté, la réaction 2 deviendra la plus importante. Ce mécanisme permet de comprendre certaines variations métaboliques observées au cours de désordres organiques, soit expérimentaux, soit d'origine pathologique. Ainsi, dans le diabète alloxanique, chez le rat, maintenu à un régime normal, riche en glucose (60 %), on observe une augmentation de la cholestérogénèse (85) à partir de l'acétate, qui peut être amoindrie lorsque le glucose alimentaire est remplacé par du fructose (86). Cette augmentation n'est pas ou est faiblement observée chez des rats rendus diabétiques et maintenus à un régime spécial pauvre en glucides (90).

Ceci est en accord avec l'accélération des réactions 2 et 3 lorsque l'on augmente la concentration en glucides de l'organisme, sans qu'il soit nécessaire de faire intervenir une régulation hormonale de ce mécanisme (120).

d) Influence des facteurs endocriniens.

Dans l'hyperthyroïdisme expérimental chez le rat, on observe également une augmentation de la vitesse de la cholestérogénèse alors que, dans l'hypothyroïdisme expérimental, c'est une diminution de ce processus qui se manifeste (29, 119, 44). Or, il faut remarquer que, dans les cas d'hyperthyroïdisme, on observe une élévation de la glycémie et on peut même, par un traitement thyroïdien prolongé, obtenir un état diabétique avec lésions des cellules β des ilôts de Langerhans (diabète métathyroïdien). Le catabolisme des graisses est exagéré et entraîne souvent une cétose ; la concentration en cholestérol sanguin est normale ou, souvent, inférieure à la normale. On peut donc aussi supposer dans ce cas une augmentation des réactions 2 et 3 par suite de l'accroissement des glucides organiques.

L'insuffisance thyroïdienne grave provoque un amaigrissement intense des animaux et la glycémie est souvent inférieure à la normale. La diminution de la vitesse de synthèse du cholestérol est peut-être due, ici aussi, à une disparition des réserves organiques en sucres et graisses, ce qui entraînerait une exaltation des réactions 1 et 3.

L'hypophysectomie chez le rat ne semble pas changer la vitesse de synthèse du cholestérol, à condition que le régime apporte une quantité suffisante de glucides (82).

Un grand nombre de faits semblent d'ailleurs en accord avec le mécanisme précédemment exposé et, dès le début des expériences

réalisées dans ce domaine, CHAIKOFF (120) avançait l'hypothèse suivant laquelle l'action stimulante de l'insuline sur la lipogénèse à partir de l'acétate, par les coupes de foie de rats privés de nourriture, était une conséquence de l'augmentation, par cette hormone, de l'utilisation du glucose pour les besoins énergétiques (33, 162), ce qui laissait les molécules d'acétate disponibles pour d'autres utilisations. L'action des hydrates de carbone qui abaissent l'oxydation de l'acide palmitique et, par là même, réduisent sa dégradation (111) dans le foie explique parfaitement l'action de l'insuline qui réduit la dégradation des acides gras chez le rat diabétique (110). Cette action de l'hormone pancréatique serait une conséquence de son rôle dans le métabolisme des hydrates de carbone.

Cette action indirecte d'une hormone sur le métabolisme des lipides a été aussi mise en évidence dans le cas de la thyroïde par ABELL, MOSBACH et KENDALL (1) qui ont montré que l'augmentation de la cholestérolémie dans les cas d'hypothyroïdisme était une manifestation de la diminution de la capacité de l'organisme à transformer le cholestérol du régime en acides biliaires.

C'est pourquoi HILL, LINAZASORO, CHEVALLIER et CHAIKOFF (83) ont été amenés dernièrement à admettre un mécanisme homéostasique de régulation de la lipogénèse hépatique à la suite de l'échec des expériences tendant à montrer une influence de l'insuline sur la synthèse des acides gras.

2 - Etude expérimentale de l'influence des graisses du régime.

Il semble cependant parfaitement établi que l'alimentation joue un grand rôle dans ce processus et ceci vient à l'appui de la régulation purement automatique par déplacement des équilibres.

Ainsi, un régime riche en graisses augmente la vitesse de synthèse du cholestérol (181), alors que l'administration d'un excès de cholestérol crée une diminution de cette vitesse de synthèse chez le chien (73), le lapin (39) et le rat (171). Il nous faut d'ailleurs remarquer que, chez le rat normal, cette augmentation de la vitesse de cholestérogénèse n'entraîne pas obligatoirement un accroissement important de la teneur en cholestérol des tissus de l'animal lorsque le régime est équilibré du point de vue protéique et que la durée d'expérimentation n'est pas supérieure à 2 mois, ainsi que nous avons pu le vérifier.

a) Sur le cholestérol hépatique.

Nous avons utilisé dans nos essais un régime enrichi en graisses d'origine animale, ce qui, d'après les observations précédentes, devait accroître la vitesse de synthèse ; or nous n'avons décelé aucune variation importante de la teneur en cholestérol du tissu hépatique dont les valeurs moyennes sont les suivantes (Tableau 3) :

Teneur en cholestérol du tissu hépatique (voir Tableau 3, p. 58) de jeunes rats recevant pendant 36 jours comme nourriture :

- un régime normal standard : $3,0 \pm 0,1$ mg de cholestérol/g de foie frais
- un régime à 10 % de saindoux : $3,2 \pm 0,1$ mg " " " " " "

On n'observe en outre aucune différence entre la croissance des animaux nourris au moyen du régime normal standard ou du régime à 10 % de saindoux. Le poids des différents organes de ces animaux, en fin d'expérience, ne présente aucune variation significative entre les deux groupes (voir Tableau 4, p. 59 et 60).

Tableau 3 - Effet sur le cholestérol hépatique de jeunes rats d'un régime contenant 10 % de saindoux.

Cholestérol hépatique en mg de cholestérol par g de foie frais					
Régime normal standard			Régime à 10 % de saindoux		
	d	d^2		d	d^2
2,97	- 0,05	0,003	3,32	+ 0,12	0,014
3,20	+ 0,18	0,032	3,28	+ 0,08	0,006
3,08	+ 0,06	0,004	3,05	- 0,15	0,022
2,99	- 0,03	0,001	3,45	+ 0,25	0,063
2,85	- 0,17	0,029	2,95	- 0,25	0,063
3,28	+ 0,26	0,067	3,10	- 0,10	0,010
2,92	- 0,10	0,010	3,34	+ 0,14	0,019
3,13	+ 0,11	0,012	3,25	+ 0,05	0,002
3,00	- 0,02	0,001	3,40	+ 0,20	0,040
2,99	- 0,03	0,001	3,20	0	
3,03	+ 0,01		3,35	+ 0,15	0,022
2,86	- 0,16	0,026	3,15	- 0,05	0,002
2,95	- 0,07	0,005	2,90	- 0,30	0,090
2,97	- 0,05	0,003	3,26	+ 0,06	0,004
2,88	- 0,14	0,019	3,40	+ 0,20	0,040
moyenne : 3,02	$\sum d^2 = 0,213$		3,20	$\sum d^2 = 0,397$	

$$s_{Mx} = \sqrt{\frac{0,213}{210}} \# 0,1 \qquad s_{My} = \sqrt{\frac{0,397}{210}} \# 0,1$$

Régime normal standard : 2,90 mg/g $<$ 3,0 mg/g $<$ 3,10 mg/g

Régime à 10 % de saindoux : 3,10 mg/g $<$ 3,2 mg/g $<$ 3,30 mg/g

b) Sur la croissance et le poids des organes.

Tableau 4.

Croissance : moyenne des valeurs extrêmes (poids en g).

jours	0	6	13	21	28	36
Régime normal standard	66 ± 5 g	74 g	84 g	103 g	121 g	134 ± 17 g
Régime à 10 % de saindoux	65 ± 5 g	75 g	81 g	102 g	119 g	133 ± 17 g

Poids des différents organes après 36 jrs (régime normal standard)

Corps (en g)	Foie (en g)	Rate (en mg)	Testicules (en g)	Surrénales (en mg)
115	4,010	280	1,607	30
107	3,802	191	2,029	30
131	4,797	273	1,980	30
132	4,898	276	2,002	33
152	5,617	216	1,982	26
122	4,567	380	1,806	29
136	5,031	400	2,002	28
169	6,455	400	2,321	41
122	4,947	361	1,815	31
116	3,990	250	1,832	30
115	4,160	219	2,080	35
100	3,530	250	1,618	35
106	3,893	248	1,793	33
123	4,072	248	1,968	36
moyennes :125 g	4,543g	298 mg	1,916 g	31 mg
moyennes rapportées à 100 g de corps :				
100 g	3,62 %	0,23 %	1,54 %	26 mg%

Poids des différents organes après 36 jrs (régime à 10 % de saindoux)

Corps	Foie	Rate	Testicules	Surrénales
110	3,414	238	1,880	22
142	4,713	327	2,073	38
137	4,955	266	2,202	33
101	4,240	200	1,850	25
122	3,983	224	2,271	31
127	4,861	390	1,658	28
128	4,752	439	1,311	25
165	6,315	493	1,840	32
145	5,690	454	2,056	29
129	4,752	245	2,206	30
175	5,363	345	2,440	25
120	3,851	209	1,885	23
133	4,339	233	2,138	32
123	4,093	277	1,569	31
moyennes: 132 g	4,663 g	310 mg	1,955 g	29 mg
moyennes rapportées à 100 g de corps :				
100 g	3,54 %	0,24 %	1,47 %	23 mg%

L'étude histologique des différents organes : foie, rate, surrénales, testicules, ne met en évidence aucune altération cellulaire. En particulier, le foie ne présente aucun début d'infiltration graisseuse.

Cette absence de différence entre la teneur en cholestérol des foies des groupes I et II peut s'expliquer soit par une excrétion accrue, soit par une destruction plus rapide de ce cholestérol.

c) Sur la cholestérolémie.

Nous devons ajouter que, dans ces conditions (régime à 10 % de saindoux), nous n'avons pas observé, au cours de la croissance des jeunes rats, l'abaissement du taux de cholestérol sanguin signalé par BARGETON et Collaborateurs (9) entre la sixième et la onzième semaine de vie.

Avec le régime enrichi en graisses, la cholestérolémie dont la valeur moyenne est plus élevée que la normale a tendance à augmenter très légèrement, ce qui constitue une condition favorable à notre expérimentation. Si nous agissons sur la synthèse du cholestérol, dans ce cas, l'effet inhibiteur sera peut-être indiqué par une diminution beaucoup plus intense de la cholestérolémie. C'est effectivement ce que nous avons observé au cours de l'expérience suivante :

Les animaux sont répartis en deux groupes de 30 rats nourris :

- l'un, avec un régime normal standard (groupe I)
- l'autre, avec un régime à 10 % de saindoux (groupe II).

Chaque groupe est divisé en deux lots de 15 rats :

- un lot pour les animaux témoins,
- un deuxième lot dans lequel chaque animal reçoit, pendant une durée de 34 jours, per os, 15 mg par jour d'acide éthyl-3 pentène-3 oïque en solution bicarbonatée. (voir Tableaux 5 et 6, p. 62 et 63).

Tableau 5 : Groupe I - Régime normal standard.

Cholestérolémie

Témoins	d	d^2	Traités	d	d^2
78 mg %	- 1	1	59 mg %	- 9	81
79	0	0	58	- 10	100
90	+ 11	121	74	+ 6	36
94	+ 15	225	75	+ 7	49
77	- 2	4	77	+ 9	81
80	+ 1	1	68	0	0
82	+ 3	9	67	- 1	1
85	+ 6	36	68	0	0
89	+ 10	100	69	+ 1	1
70	- 9	81	71	+ 3	9
69	- 10	100	68	0	0
75	- 4	16	67	- 1	1
71	- 8	64	65	- 3	9
68	- 11	121	58	- 10	100
78	- 1	1	71	+ 3	9

$M.T_x$ = 79 mg % $\quad \sum d^2 = 880$ $\quad M.T_y$ = 68 $\quad \sum d^2 = 477$

$$s_{M_x} = \sqrt{\frac{880}{210}} \# 2,0 \qquad s_{M_y} = \sqrt{\frac{477}{210}} \# 1,5$$

Témoins : 79 ± 2 mg %

Traités : $68 \pm 1,5$ mg %

$t_{calc.} = 4,33 > t_{théor.} = 2,675$

La différence de 13 % observée entre les deux valeurs du cholestérol sanguin est largement significative.

Tableau 6 : Groupe II - Régime à 10 % de saindoux.

Cholestérolémie

Témoins	d	d^2	Traités	d	d^2
88 mg %	0	0	65 mg %	- 6	36
93	+ 5	25	70	+ 1	1
91	+ 3	9	62	- 9	81
87	- 1	1	63	- 8	64
94	+ 6	36	68	- 3	9
81	- 7	49	70	- 1	1
84	- 4	16	65	- 6	36
82	- 6	36	64	- 7	49
78	- 10	100	71	0	0
87	- 1	1	81	+ 10	100
84	- 4	16	68	- 3	9
91	+ 3	9	72	+ 1	1
97	+ 9	81	74	+ 3	9
100	+ 12	144	85	+ 14	196
88	0	0	80	+ 9	81

$M.T_x$ = 88 mg % $\quad \Sigma d^2 = 523$ $\quad M.T_y$ = 71 mg % $\quad \Sigma d^2 = 673$

$$s_{M_x} = \sqrt{\frac{523}{210}} \# 1,6 \qquad s_{M_y} = \sqrt{\frac{673}{210}} \# 1,8$$

Témoins : $88 \pm 1,6$ mg %

Traités : $71 \pm 1,8$ mg %

$$t_{calc.} = 6,83 > t_{théor.} = 2,675$$

La différence de 19 % observée entre les deux valeurs du cholestérol sanguin est significative.

Nous pouvons résumer ces résultats de la manière suivante :

Régime normal standard :

Cholestérol sanguin - Témoins : 79 mg %
Traités : 68 mg %
Abaissement : - 13 %

Régime à 10 % de saindoux :

Cholestérol sanguin - Témoins : 88 mg %
Traités : 71 mg %
Abaissement : - 19 %

La différence ainsi observée s'explique aisément si l'on tient compte que l'expérience a duré 34 jours et que, dans le cas des animaux du groupe I, la vie moyenne du cholestérol de l'organisme est d'environ 31 à 32 jours, alors que, dans le cas du groupe II ayant reçu un régime enrichi en graisses, la durée de demi-vie du cholestérol est fortement abaissée (134), puisque la vitesse de synthèse est accrue et la concentration en cholestérol de l'organisme maintenue constante.

La durée de demi-vie étant de 30 jours chez les témoins, il faut que 50 % du cholestérol total de l'organisme soient resynthétisés en 30 jours ; ainsi, sans tenir compte des processus de rééquilibration et en admettant une inhibition de 20 % de la synthèse (67), on voit que l'on doit observer une diminution de 10 % du taux de cholestérol tissulaire au bout de 30 jours.

Dans le cas des animaux recevant un régime avec saindoux, si l'on tient compte d'une durée de demi-vie ramenée à 15 jours, du fait de l'augmentation de la vitesse de synthèse (89), on voit que le cholestérol total doit être complètement remplacé en 30 jours et, l'inhibition étant de 20 %, on doit observer une diminution de 20 % du cholestérol de l'organisme. Cette explication

simplifie évidemment le problème à l'extrême car elle ne tient pas compte des processus de régulation physiologique qui peuvent entraîner une diminution de la vitesse de dégradation ou d'excrétion (seuil) pour maintenir l'équilibre interne.

3 - Protocole expérimental préconisé.

Nous pouvons, après cette étude préliminaire de l'influence des conditions expérimentales sur l'effet hypocholestérolémiant des dérivés étudiés, proposer un protocole expérimental valable qui permet d'obtenir une réponse nette en l'espace de 30 à 40 jours avec deux groupes de 15 rats. Nous avons au préalable éprouvé cette technique au moyen d'un hypocholestérolémiant déjà connu, l'acide phényl-éthyl-acétique. Les résultats positifs obtenus nous ont conduits à utiliser cette méthode pour les composés que nous nous proposions d'étudier.

Nous utilisons de jeunes rats en voie de croissance, d'un poids moyen de 60 g au début de l'expérience, qui reçoivent ad libitum un régime équilibré mais contenant une proportion de graisses saturées importantes (régime à 10 % de saindoux décrit p. 42). Ainsi, les animaux témoins présentent une montée régulière de la cholestérolémie qui se stabilise d'ailleurs, après deux mois d'expérimentation, à une valeur proche de 90 mg %. La différence entre la cholestérolémie moyenne du groupe témoin et du groupe traité permet de juger de l'activité du produit utilisé. Les dosages du cholestérol hépatique et des acides gras de ce tissu apportent une preuve supplémentaire de cette action.

2°) RESULTATS OBTENUS.

1 - Tableau récapitulatif.

Nous avons groupé dans le tableau 7 ci-après les valeurs moyennes de la cholestérolémie obtenues au cours de l'expérimentation biologique de divers composés du groupe des acides αβ ou βγ-insaturés.

Tableau 7

Substances étudiées	Cholestérolémie en mg % (*)		Variation en % de la valeur initiale
	Témoins	Traités	
Témoin : Acide phényl-éthyl-acétique (36) 30 mg/j pendant 26 jrs	79	69	- 13
1 - Acide diméthyl-3,3 acrylique 30 mg/j pendant 26 jrs	79	85	+ 8
2 - Acide méthyl-3 pentène-2 oïque (124) 30 mg/j pendant 30 jrs	82	84	+ 3
3 - Acide méthyl-3 pentène-3 oïque (124) 30 mg/j pendant 26 jrs	80	68	- 15
15 mg/j pendant 36 jrs	87	78	- 11
4 - Amide de l'acide méthyl-3 pentène-3 oïque 35 mg/j pendant 30 jrs	82	78	- 5
5 - Acide méthyl-3 hexène-3 oïque 30 mg/j pendant 30 jrs	79	72	- 9
30 mg/j pendant 36 jrs	87	78	- 10
6 - Acide éthyl-3 pentène-2 oïque 30 mg/j pendant 30 jrs	81	78	- 4

7 - Acide éthyl-3 pentène-3 oïque (133)			
15 mg/j pendant 36 jrs	88	71	- 19
15 mg/j pendant 45 jrs	90	72	- 20
15 mg/j pendant 34 jrs (régime normal standard)	79	68	- 14
8 - Acide méthyl-3 heptène-3 oïque			
30 mg/j pendant 30 jrs	79	79	0
9 - Acide diméthyl-3,5 hexène-2 oïque			
30 mg/j pendant 40 jrs	89	84	- 5
10 - Acide diméthyl-3,5 hexène-3 oïque			
30 mg/j pendant 30 jrs	81	70	- 13
15 mg/j pendant 36 jrs	88	78	- 11
15 mg/j pendant 40 jrs	89	78	- 12
11 - Acide diméthyl-3,7 octadiène-2,6 oïque (acide géranique)			
30 mg/j pendant 30 jrs	80	81	+ 1
12 - Acide diméthyl-3,7 octadiène-3,6 oïque			
30 mg/j pendant 30 jrs	80	79	- 1
13 - Acide diméthyl-3,5 hydroxy-3 hexanoïque			
30 mg/j pendant 40 jrs	89	83	- 7
14 - Diméthyl-3,5 hexène-2 oate d'éthyle			
30 mg/j pendant 40 jrs	89	88	- 1
15 - Acide diméthyl-3,5 hexanoïque			
30 mg/j pendant 40 jrs	89	88	- 1
16 - Acide isobutyl-3 méthyl-5 hexène-3 oïque			
30 mg/j pendant 30 jrs	82	81	- 1

17 - Acide méthyl-3 cinnamique			
30 mg/j pendant 30 jrs	81	80	- 1
18 - Acide éthyl-3 cinnamique			
30 mg/j pendant 40 jrs	89	95	+ 7
19 - Acide diphényl-3,4 butène-3 oïque			
30 mg/j pendant 35 jrs	83	72	- 13
30 mg/j pendant 45 jrs	90	77	- 15
20 - Acide (p-hydroxy-phényl)-3 pentène-3 oïque			
15 mg/j pendant 30 jrs	81	71	- 12
21 - Acide cyclo-pentène-1 acétique			
30 mg/j pendant 30 jrs	81	68	- 16
22 - Acide cyclo-pentylidène-acétique			
30 mg/j pendant 30 jrs	81	72	- 11
23 - Acide cyclo-hexylidène-acétique			
30 mg/j pendant 30 jrs	81	75	- 7
24 - Oxyde de mésitylo			
19 mg/j pendant 40 jrs	89	101	+ 13

(*) Les groupes témoins et traités sont constitués chacun de 15 rats.

2 - Résultats détaillés.

Nous rapportons ici les résultats détaillés de l'expérimentation biologique de quelques-uns des composés essayés.

Nous indiquerons après la première expérience la méthode utilisée pour apprécier la validité statistique des différences observées.

Dans tous ces essais, les animaux ont reçu ad libitum le régime à 10 % de saindoux précédemment décrit.

La croissance des animaux qui permet de juger de la toxicité du composé administré a été calculée au moyen du rapport :

$$\text{croissance en \%} = \frac{\text{Augmentation de poids durant l'expérience}}{\text{poids initial}}$$

Tableau 8 - Acide méthyl-3 pentène-2 oïque (124)

$$CH_3 - CH_2 - \overset{CH_3}{\overset{|}{C}} = CH - COOH$$

- 30 mg/j pendant 28 jrs.

- Croissance - Témoins : 100 %

Traités : 109 %

Cholestérolémie (en mg/p. 100 cm3)

Témoins	Traités
96 mg %	88 mg %
92	88
88	83
78	91
73	81
82	71
83	68
69	101
72	88
91	82
78	78
80	77
78	98
99	77
78	76

M_x = 82 mg % M_y = 84 mg %

Ce composé ne présente aucune activité hypocholestérolémiante.

Tableau 9 - Acide méthyl-3 pentène-3 oïque (124)

$$CH_3 - CH = \overset{CH_3}{\underset{|}{C}} - CH_2 - COOH$$

- 15 mg par jour pendant 36 jrs.
- Croissance - Témoins : 130 %
  Traités : 126 %

Cholestérolémie (en mg/p. 100 cm3)

Témoins	d	d^2	Traités	d	d^2
95 mg %	+ 8	64	85 mg %	+ 7	49
69	- 18	334	87	+ 9	81
70	- 17	289	77	- 1	1
82	- 5	25	70	- 8	64
92	+ 5	25	79	+ 1	1
104	+ 17	289	64	- 14	196
82	- 5	25	79	+ 1	1
99	+ 12	144	71	- 7	49
100	+ 13	169	80	+ 2	4
90	+ 3	9	86	+ 8	64
94	+ 7	49	77	- 1	1
85	- 2	4	85	+ 7	49
82	- 5	25	82	+ 4	16
77	- 10	100	75	- 3	9
91	+ 4	16	76	- 2	4

M_x = 87 mg % $\sum d^2$ = 1.567 M_y = 78 mg % $\sum d^2$ = 589

Valeur statistique de cette expérience.

La moyenne arithmétique de chacune de ces séries est égale à : M_x = 87 mg % chez les animaux témoins,

M_y = 78 mg % chez les animaux traités,

pour les n = 15 mesures effectuées dans chaque série.

La somme des carrés $\sum d^2$ de la différence (d) entre chaque valeur individuelle et la moyenne arithmétique M permet de calculer la déviation standard (s_M) du moyen terme pour les n = 15 valeurs déterminées, d'après la formule :

$$s_M = \sqrt{\frac{\sum d^2}{n\,(n-1)}}$$

Le terme s_M représente ainsi une mesure de l'exactitude avec laquelle le moyen terme M est calculé ; il a pour valeur dans les deux séries de mesures envisagées :

$$s_{M_x} = \sqrt{\frac{1567}{210}} = \sqrt{7,46} \# 2,73 \text{ pour les animaux témoins,}$$

$$s_{M_y} = \sqrt{\frac{589}{210}} = \sqrt{2,8} \# 1,67 \text{ pour les animaux traités.}$$

La moyenne de chacune des séries peut ainsi s'exprimer, en tenant compte de la dispersion des résultats, sous la forme :

Cholestérolémie des animaux témoins : $87 \pm 2,7$ mg %

Cholestérolémie des animaux traités : $78 \pm 1,7$ mg %.

La différence $M_x - M_y$, soit 87 - 78 = 9, entre ces deux valeurs moyennes est-elle statistiquement valable ?

Pour le savoir, il nous faut comparer cette différence à la variabilité, c'est à dire à la somme des différences les plus extrêmes qui peuvent être attribuées au hasard seul.

Pour effectuer cette comparaison, il nous suffit de calculer le rapport $t_{calc.}$ de cette différence à la variabilité,

$$t_{calc.} = \frac{M_x - M_y}{\sqrt{(s_{M_x})^2 + (s_{M_y})^2}}$$

qui, dans notre cas, est égal à :

$$t_{calc.} = \frac{87 - 78}{\sqrt{7,46 + 2,8}} = 2,82$$

Plus ce rapport "t" est grand, plus la probabilité pour que la différence observée soit due au hasard est faible.

Pour un nombre déterminé de mesures, le calcul permet de prévoir la limite de ce rapport au-dessus de laquelle la probabilité d'intervention du hasard devient pratiquement nulle (60). Dans notre cas, nous avons 15 mesures pour chacune de ces expériences, ce qui correspond à un degré de liberté $N = n_x + n_y - 2 = 28$, auquel correspond une valeur théorique de $t_{théor.} = 2,763$ pour un degré de probabilité $P = 0,01$.

Comme notre rapport $t_{calc.} = 2,82$ est supérieur au rapport $t_{théor.} = 2,763$, nous pouvons conclure que cette différence de 9 entre les valeurs de la cholestérolémie des animaux témoins et des animaux traités est statistiquement significative. Les probabilités d'erreur sur la signification de cette différence sont très faibles puisqu'elles sont inférieures à 1 % ($P = 0,01$).

Tableau 10 - Acide méthyl-3 pentène-3 oïque.

- 30 mg par jour pendant 26 jours.

- Croissance : Témoins : 102 %
  Traités : 98 %

Cholestérolémie (en mg/p. 100 cm3)

Témoins	d	d^2	Traités	d	d^2
74 mg %	- 6	36	67 mg %	- 1	1
80	0	0	57	- 11	121
100	+ 20	400	62	- 6	36
90	+ 10	100	66	- 2	4
80	0	0	69	+ 1	1
65	- 15	225	80	+ 12	144
80	0	0	65	- 3	9
65	- 15	225	63	- 5	25
90	+ 10	100	90	+ 22	484
82	+ 2	4	65	- 3	9
79	- 1	1	69	+ 1	1
70	- 10	100	66	- 2	4
84	+ 4	16	70	+ 2	4
76	- 4	16	67	- 1	1
80	0	0	72	+ 4	16

M_x = 80 mg % $\quad \sum d^2 = 1223$ $\quad M_y$ = 68 mg % $\quad \sum d^2 = 860$

$$s_{M_x} = \sqrt{\frac{1223}{210}} \# 2{,}42 \qquad s_{M_y} = \sqrt{\frac{860}{210}} \# 2$$

Cholestérolémie des animaux témoins : $80 \pm 2{,}4$ mg %

Cholestérolémie des animaux traités : $68 \pm 2{,}0$ mg %.

La différence de - 15 % entre les valeurs de la cholestérolémie moyenne du groupe témoin et du groupe traité est statistiquement significative puisque :

$$t_{calc.} = 3{,}8 > t_{théor.} = 2{,}763.$$

Tableau 11 - Amide de l'acide méthyl-3 pentène-3 oïque

$$CH_3 - CH = \overset{CH_3}{\overset{|}{C}} - CH_2 - CO - NH_2$$

- 35 mg par jour pendant 30 jours.

- Croissance - Témoins : 103 %
Traités : 105 %

Cholestérolémie (en mg/p. 100 cm3)

Témoins	d	d^2	Traités	d	d^2
87 mg %	+ 5	25	86 mg %	+ 8	64
91	+ 9	81	87	+ 9	81
89	+ 7	49	79	+ 1	1
97	+ 15	225	89	+ 11	121
hémolysé			77	- 1	1
91	+ 9	81	67	- 11	121
82	0	0	77	- 1	1
73	- 9	81	79	+ 1	1
67	- 15	225	73	- 5	25
69	- 13	169	77	- 1	1
73	- 9	81	66	- 12	144
75	- 7	49	87	+ 9	81
87	+ 5	25	68	- 10	100
82	0	0	75	- 3	9
75	- 7	49	75	- 3	9

$M_x = 82$ mg % $\quad \sum d^2 = 1140$ $\quad M_y = 78$ mg % $\quad \sum d^2 = 760$

$$s_{M_x} = \sqrt{\frac{1140}{182}} \# 2,5 \qquad s_{M_y} = \sqrt{\frac{760}{210}} \# 1,9$$

Cholestérolémie des animaux témoins : $82 \pm 2,5$ mg %

Cholestérolémie des animaux traités : $78 \pm 1,9$ mg %.

La différence de - 5 % entre les valeurs de la cholestérolémie moyenne des groupes témoin et traité n'a pas de signification statistique puisque :

$$t_{calc.} = 1,27 < t_{théor.} = 2,763.$$

Tableau 12 - Acide éthyl-3 pentène-3 oïque. (133)

$$CH_3 - CH = \overset{C_2H_5}{\overset{|}{C}} - CH_2 - COOH$$

- 15 mg par jour pendant 45 jours.

- Croissance - Témoins : 149 %
  Traités : 158 %

Cholestérolémie (en mg/p. 100 cm3)

Témoins	d	d^2	Traités	d	d^2
104 mg %	+ 14	196	72 mg %	0	0
77	- 13	169	72	0	0
102	+ 12	144	69	- 3	9
91	+ 1	1	82	+ 10	100
91	+ 1	1	87	+ 15	225
89	- 1	1	79	+ 7	49
87	- 3	9	69	- 3	9
87	- 3	9	77	+ 5	25
82	- 8	64	52	- 20	400
91	+ 1	1	74	+ 2	4
87	- 3	9	59	- 13	169
91	+ 1	1	62	- 10	100
91	+ 1	1	84	+ 12	144
79	- 11	121	74	+ 2	4
87	- 3	9	69	- 3	9

$M_x = 90$ mg % $\quad \sum d^2 = 736$ $\quad M_y = 72$ mg % $\quad \sum d^2 = 1247$

$$s_{M_x} = \sqrt{\frac{736}{210}} \# 1,9 \qquad s_{M_y} = \sqrt{\frac{1247}{210}} \# 2,4$$

Cholestérolémie des animaux témoins : $90 \pm 1,9$ mg %

Cholestérolémie des animaux traités : $72 \pm 2,4$ mg %.

La différence de - 20 % entre les valeurs de la cholestérolémie moyenne des groupes témoin et traité est statistiquement significative car :

$$t_{calc.} = 5,87 > t_{théor.} = 2,763.$$

Tableau 13 - Acide méthyl-3 heptène-3 oïque.

$$CH_3 - CH_2 - CH_2 - CH = \overset{CH_3}{\underset{|}{C}} - CH_2 - COOH$$

- 30 mg par jour pendant 26 jours.

- Croissance - Témoins : 107 %
  Traités : 112 %

Cholestérolémie (en mg p. 100 cm3)

Témoins	d	d^2	Traités	d	d^2
79 mg %	0	0	70 mg %	- 9	81
88	+ 9	81	80	+ 1	1
90	+ 11	121	79	0	0
80	+ 1	1	89	+ 10	100
76	- 3	9	77	- 2	4
79	0	0	87	+ 8	64
81	+ 2	4	86	+ 7	49
84	+ 5	25	67	- 12	144
72	- 7	49	79	0	0
87	+ 8	64	73	- 6	36
69	- 10	100	77	- 2	4
73	- 6	36	87	+ 8	64
71	- 8	64	78	- 1	1
70	- 9	81	75	- 4	16
78	- 1	1	75	- 4	16

$M_x = 79$ mg % $\sum d^2 = 636$ $M_y = 79$ mg % $\sum d^2 = 580$

$$s_{M_y} = \sqrt{\frac{636}{210}} \# 1,7 \qquad s_{M_y} = \sqrt{\frac{580}{210}} \# 1,6$$

Cholestérolémie des animaux témoins : $79 \pm 1,7$ mg %

Cholestérolémie des animaux traités : $79 \pm 1,6$ mg % .

Ce composé ne présente pas d'activité hypocholestérolémiante.

Tableau 14 - Acide diméthyl-3,5 hexène-3 oïque.

$$CH_3 - \underset{\displaystyle CH_3}{\underset{|}{CH}} - CH = \underset{\displaystyle CH_3}{\underset{|}{C}} - CH_2 - COOH$$

- 30 mg par jour pendant 30 jours.

- Croissance - Témoins : 117 %
Traités : 109 %

Cholestérolémie (en mg/p. 100 cm3)

Témoins	d	d^2	Traités	d	d^2
74 mg %	- 7	49	70	0	0
80	- 1	1	65	- 5	25
100	+ 19	361	70	0	0
90	+ 9	81	65	- 5	25
80	- 1	1	60	- 10	100
80	- 1	1	80	+ 10	100
68	- 13	169	95	+ 15	225
70	- 11	121	55	- 15	225
85	+ 4	16	63	- 7	49
94	+ 13	169	75	+ 5	25
81	0	0	68	- 2	4
78	- 3	9	72	+ 2	4
70	- 11	121	73	+ 3	9
82	+ 1	1	67	- 3	9
76	- 5	25	71	- 1	1

$M_x = 81$ mg % $\quad \Sigma d^2 = 1125$ $\quad M_y = 70$ mg % $\quad \Sigma d^2 = 801$

$$s_{M_x} = \sqrt{\frac{1125}{210}} \# 2,3 \qquad s_{M_y} = \sqrt{\frac{801}{210}} \# 2,0$$

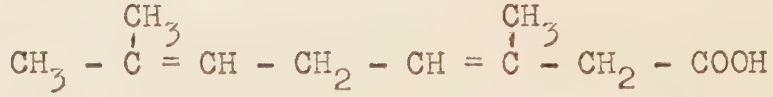
Cholestérolémie des animaux témoins : $81 \pm 2,3$ mg %

Cholestérolémie des animaux traités : $70 \pm 2,0$ mg %.

La différence de - 14 % entre les valeurs de la cholestérolémie moyenne des groupes témoin et traité est significative puisque :

$$t_{calc.} = 3,02 > t_{théor.} = 2,763$$

Tableau 15 - Acide diméthyl-3,7 octadiène-3,6 oïque.



- 30 mg par jour pendant 30 jours.

- Croissance : Témoins : 112 %
  Traités : 109 %

Cholestérolémie (en mg/p. 100 cm3)

Témoins	d	d^2	Traités	d	d^2
78 mg %	- 2	4	84 mg %	+ 5	25
70	- 10	100	70	- 9	81
75	- 5	25	86	+ 7	49
79	- 1	1	82	+ 3	9
78	- 2	4	80	+ 1	1
77	- 3	9	76	- 3	9
90	+ 10	100	78	- 1	1
79	- 1	1	75	- 4	16
83	+ 3	9	79	0	0
87	+ 7	49	72	- 7	49
81	+ 1	1	78	- 1	1
85	+ 5	25	76	- 3	9
			82	+ 3	9
3 rats morts (maladie)			79	0	0
			80	+ 1	1
M_x = 80 mg %		$\sum d^2$ = 328	M_y = 79 mg %		$\sum d^2$ = 260

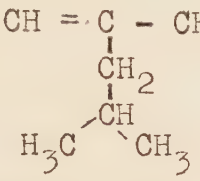
$$s_{M_x} = \sqrt{\frac{328}{132}} \# 1,4 \qquad s_{M_y} = \sqrt{\frac{260}{210}} \# 1,1$$

Cholestérolémie des animaux témoins : $80 \pm 1,4$ mg %

Cholestérolémie des animaux traités : $79 \pm 1,1$ mg %.

Il n'y a pas de différence significative entre les cholestérolémies moyennes des groupes témoin et traité.

Tableau 16 - Acide méthyl-5 isobutyl-3 hexène-3 oïque



- 30 mg par jour pendant 30 jours.

- Croissance - Témoins : 116 %
  Traités : 114 %

Cholestérolémie (en mg/p. 100 cm3)

Témoins	d	d^2	Traités	d	d^2
87 mg %	+ 5	25	83 mg %	+ 2	4
77	- 5	25	81	0	0
83	+ 1	1	76	- 5	25
81	- 1	1	80	- 1	1
91	+ 9	81	78	- 3	9
73	- 9	81	79	- 2	4
78	- 4	16	85	+ 4	16
80	- 2	4	81	0	0
86	+ 4	16	88	+ 7	49
76	- 6	36	74	- 7	49
79	- 3	9	84	+ 3	9
81	- 1	1	83	+ 2	4
84	+ 2	4	79	- 2	4
82	0	0	80	- 1	1
88	+ 6	36	82	+ 1	1
M_x = 82 mg %		Σd^2 = 336	M_y = 81 mg %		Σd^2 = 176

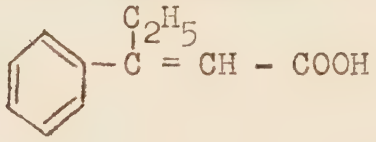
$$s_{M_x} = \sqrt{\frac{336}{210}} \# 1,2 \qquad s_{M_y} = \sqrt{\frac{176}{210}} \# 0,9$$

Cholestérolémie des animaux témoins : $82 \pm 1,2$ mg %

Cholestérolémie des animaux traités : $81 \pm 0,9$ mg %

Ce composé ne présente pas d'activité hypocholestérolémiante.

Tableau 17 - Acide éthyl-3 cinnamique.



- 30 mg/jour pendant 40 jrs

- Croissance - Témoins : 115 %
  Traités : 106 %

Cholestérolémie (en mg/p. 100 cm3)

Témoins	d	d^2	Traités	d	d^2
109 mg %	+ 20	400	107 mg %	+ 12	144
99	+ 10	100	106	+ 11	121
92	+ 3	9	94	- 1	1
86	- 3	9	82	- 13	169
87	- 2	4	89	- 6	36
83	- 6	35	93	- 2	4
80	- 9	81	94	- 1	1
84	- 5	25	100	+ 5	25
99	+ 10	100	116	+ 21	441
82	- 7	49	97	+ 2	4
89	0	0	93	- 2	4
86	- 3	9	83	- 12	144
83	- 6	36	93	- 2	4
81	- 8	64	94	- 1	1
105	+ 16	256	93	- 2	4

$M_x = 89$ mg % $\quad \Sigma d^2 = 1178$ $\quad M_y = 95$ mg % $\quad \Sigma d^2 = 1103$

$$s_{M_x} = \sqrt{\frac{1178}{210}} \# 2,4 \qquad s_{M_y} = \sqrt{\frac{1103}{210}} \# 2,3$$

Cholestérolémie des animaux témoins : $89 \pm 2,4$ mg %

Cholestérolémie des animaux traités : $95 \pm 2,3$ mg %.

Ce composé ne présente pas d'activité hypocholestérolémiante.

Tableau 18 - Acide diphényl-3,4 butène-3 oïque.

$$C_6H_5 - CH = C\begin{matrix}\diagup CH_2 - COOH \\ \diagdown C_6H_5\end{matrix}$$

- 30 mg par jour pendant 40 jours.

- Croissance - Témoins : 112 %
  Traités : 117 %

Cholestérolémie (en mg/p. 100 cm3)

Témoins	d	d^2	Traités	d	d^2
104 mg %	+ 14	196	80	+ 3	9
77	- 13	169	82	+ 5	25
102	+ 12	144	77	0	0
91	+ 1	1	72	- 5	25
91	+ 1	1	70	- 7	49
87	- 3	9	83	+ 6	36
91	+ 1	1	71	- 6	36
89	- 1	1	86	+ 9	81
92	+ 2	4	84	+ 7	49
87	- 3	9	73	- 4	16
92	+ 2	4	78	+ 1	1
87	- 3	9	79	+ 2	4
79	- 11	121	68	- 9	81
90	0	0	76	- 1	1
87	- 3	9	83	+ 6	36

$M_x = 90$ mg % $\quad \Sigma d^2 = 678$ $\quad M_y = 77$ mg % $\quad \Sigma d^2 = 449$

$$s_{M_x} = \sqrt{\frac{678}{210}} \# 1,9 \qquad s_{M_y} = \sqrt{\frac{449}{210}} \# 1,5$$

Cholestérolémie des animaux témoins : $90 \pm 1,9$ mg %

Cholestérolémie des animaux traités : $77 \pm 1,5$ mg %.

La différence de - 14 % entre les valeurs de la cholestérolémie moyenne des groupes témoin et traité est largement significative car :

$$t_{calc.} = 5,50 > t_{théor.} = 2,763.$$

Tableau 19 - Acide cyclo-pentylidène acétique.

= CH - COOH

- 30 mg par jour pendant 30 jours.

- Croissance - Témoins : 119 %
  Traités : 127 %

Cholestérolémie (en mg/p. 100 cm3)

Témoins	d	d^2	Traités	d	d^2
94 mg %	+ 13	169	78 mg %	+ 6	36
70	- 11	121	75	+ 3	9
92	+ 11	121	82	+ 10	100
82	+ 1	1	76	+ 4	16
82	+ 1	1	74	+ 2	4
82	+ 1	1	71	- 1	1
80	- 1	1	65	- 7	49
78	- 3	9	58	- 14	196
79	- 2	4	71	- 1	1
74	- 7	49	62	- 10	100
82	+ 1	1	62	- 10	100
79	- 2	4	69	- 3	9
82	+ 1	1	80	+ 8	64
71	- 10	100	74	+ 2	4
78	- 3	9	74	+ 2	4

M_x = 81 mg % $\quad \sum d^2 = 592$ $\quad M_y$ = 72 mg % $\quad \sum d^2 = 693$

$$s_{M_x} = \sqrt{\frac{592}{210}} \# 1,7 \qquad s_{M_y} = \sqrt{\frac{693}{210}} \# 1,8$$

Cholestérolémie des animaux témoins : $81 \pm 1,7$ mg %

Cholestérolémie des animaux traités : $72 \pm 1,8$ mg %.

La différence de - 11 % entre les valeurs de la cholestérolémie moyenne des groupes témoin et traité est significative puisque :

$$t_{calc.} = 3,68 > t_{théor.} = 2,763.$$

Tableau 20 - Acide cyclo-hexylidène acétique.

= CH - COOH

- 30 mg par jour pendant 30 jours.

- Croissance - Témoins : 109 %
  Traités : 112 %

Cholestérolémie (en mg/p. 100 cm3)

Témoins	d	d^2	Traités	d	d^2
94 mg %	+ 13	169	89 mg %	+ 14	196
70	- 11	121	84	+ 9	81
92	+ 11	121	69	- 6	36
82	+ 1	1	67	- 8	64
82	+ 1	1	74	- 1	1
82	+ 1	1	80	+ 5	25
80	- 1	1	82	+ 7	49
78	- 3	9	78	+ 3	9
79	- 2	4	75	0	0
74	- 7	49	67	- 8	64
82	+ 1	1	78	+ 3	9
79	- 2	4	76	+ 1	1
82	+ 1	1	75	0	0
71	- 10	100	78	+ 3	9
78	- 3	9	69	- 6	36

$M_x = 81$ mg % $\quad \sum d^2 = 592$ $\quad M_y = 75$ mg % $\quad \sum d^2 = 580$

$$s_{M_x} = \sqrt{\frac{592}{210}} \# 1,7 \qquad s_{M_y} = \sqrt{\frac{580}{210}} \# 1,6$$

Cholestérolémie des animaux témoins : $81 \pm 1,7$ mg %

Cholestérolémie des animaux traités : $75 \pm 1,6$ mg %.

Ce résultat n'est pas significatif puisque :

$$t_{calc.} = 2,54 < t_{théor.} = 2,763.$$

Tableau 21 - Oxyde de mésityle.

$$\begin{matrix} CH_3 \\ CH_3 \end{matrix} \!\!>\!\! C = CH - CO - CH_3$$

- 19 mg par jour pendant 40 jours.

- Croissance - Témoins : 115 %
  Traités : 80 %.

Cholestérolémie (en mg/p. 100 cm3)

Témoins	d	d^2	Traités	d	d^2
109 mg %	+ 20	400	98 mg %	- 3	9
99	+ 10	100	92	- 9	81
92	+ 3	9	109	+ 8	64
86	- 3	9	81	- 20	400
87	- 2	4	98	- 3	9
83	- 6	36	99	- 2	4
80	- 9	81	129	+ 28	784
84	- 5	25	95	- 6	36
99	+ 10	100	98	- 3	9
82	- 7	49	98	- 3	9
89	- 10	100	99	- 2	4
86	- 3	9	126	+ 25	625
83	- 6	36	92	- 9	81
81	- 8	64	99	- 2	4
105	+ 16	256	109	+ 8	64

$M_x = 89$ mg % $\quad \Sigma d^2 = 1278$ $\quad M_y = 101$ mg % $\quad \Sigma d^2 = 2183$

$$s_{M_x} = \sqrt{\frac{1278}{210}} \# 2,4 \qquad s_{M_y} = \sqrt{\frac{2183}{210}} \# 3,2$$

Cholestérolémie des animaux témoins : $89 \pm 2,4$ mg %

Cholestérolémie des animaux traités : $101 \pm 3,2$ mg %.

L'augmentation de la cholestérolémie du groupe traité est statistiquement valable, car :

$$t_{calc.} = 3,0 \gg t_{théor.} = 2,763.$$

Tableau 22 - Acide α-phényl-cinnamique (forme cis)

- 30 mg par jour pendant 30 jours.

Cholestérolémie (en mg/p. 100 cm3)

Témoins	d	d^2	Traités	d	d^2
87 mg %	+ 3	9	86 mg %	+ 8	64
80	- 4	16	91	+ 13	169
85	+ 1	1	74	- 4	16
90	+ 6	36	76	- 2	4
79	- 5	25	80	+ 2	4
82	- 2	4	73	- 5	25
86	+ 2	4	82	+ 4	16
81	- 3	9	72	- 6	36
88	+ 4	16	77	- 1	1
78	- 6	36	67	- 11	121
85	+ 1	1	83	+ 5	25
84	0	0	87	+ 9	81
83	- 1	1	81	+ 3	9
87	+ 3	9	76	- 2	4
84	0	0	72	- 6	36

M_x = 84 mg % $\quad \Sigma d^2 = 167$ $\quad M_y$ = 78 mg % $\quad \Sigma d^2 = 611$

$$s_{M_x} = \sqrt{\frac{167}{210}} \# 0,9 \qquad s_{M_y} = \sqrt{\frac{611}{210}} \# 1,7$$

Cholestérolémie des animaux témoins : $84 \pm 0,9$ mg %

Cholestérolémie des animaux traités : $78 \pm 1,7$ mg %.

La différence de - 7 % entre les valeurs de la cholestérolémie moyenne des groupes témoin et traité est peu significative puisque :

$$t_{calc.} = 3 \gtrless t_{théor.} = 2,763$$

Tableau 22bis - Acide α -phényl-cinnamique (forme trans)

- 30 mg par jour pendant 30 jours.

Cholestérolémie (en mg/p. 100 cm3)

Témoins	d	d^2	Traités	d	d^2
87 mg %	+ 3	9	64 mg %	- 7	49
80	- 4	16	67	- 4	16
85	+ 1	1	82	+ 11	121
90	+ 6	36	79	+ 8	64
79	- 5	25	65	- 6	36
82	- 2	4	63	- 8	64
86	+ 2	4	63	- 8	64
81	- 3	9	85	+ 14	196
88	+ 4	16	65	- 6	36
78	- 6	36	64	- 7	49
85	+ 1	1	81	+ 10	100
84	0	0	83	+ 12	144
83	- 1	1	67	- 4	16
87	+ 3	9	63	- 8	64
84	0	0	65	- 6	36

$M_x = 84$ mg % $\quad \Sigma d^2 = 167$ $\quad M_y = 71$ mg % $\quad \Sigma d^2 = 1055$

$s_{M_x} \# 0,9$ $\quad s_{M_y} = \sqrt{\frac{1055}{210}} \# 2,2$

Cholestérolémie des animaux témoins : $84 \pm 0,9$ mg %

Cholestérolémie des animaux traités : $71 \pm 2,2$ mg %.

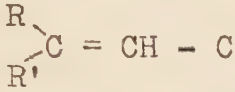
La différence de - 15 % entre les valeurs de la cholestérolémie moyenne des groupes témoin et traité est largement significative car :

$$t_{calc.} = 5,4 > t_{théor.} = 2,763.$$

3°) DISCUSSION DES RESULTATS.

1 - Activité comparée des acides αβ - et βγ-insaturés.

L'essai biologique des composés αβ-insaturés de type général (I),



effectué chez le rat blanc n'a pas donné d'abaissement significatif du taux de cholestérol sanguin, ni du taux de cholestérol hépatique. Nous avons alors supposé que l'inactivité de ces produits comme hypocholestérolémiants, alors que l'acide diméthyl-acrylique, dans les mêmes conditions, provoque une élévation du taux de cholestérol de l'organisme, était due à leur dégradation rapide dans l'organisme animal. Nous avons pu, dans le cas de l'acide méthyl-3 cinnamique, mettre en évidence, au moyen de la chromatographie sur papier (63), une augmentation du taux d'acide hippurique dans l'urine des animaux ingérant cet acide cinnamique substitué (189). C'est pourquoi nous avons synthétisé des acides de même squelette carboné, mais où la double liaison éthylénique avait migré de la position αβ à la position βγ ; ces acides étaient de ce fait, jusqu'à un certain point, à l'abri de la dégradation par β-oxydation.

L'essai biologique du premier de ces composés, l'acide méthyl-3 pentène-3 oïque, $CH_3 - CH = \underset{\underset{CH_3}{|}}{C} - CH_2 - COOH$

nous a montré qu'il provoquait un abaissement statistiquement significatif de 13 % du taux de cholestérol sérique et de 30 à 40 % du taux de cholestérol hépatique, après une période d'administration de 30 jours, à la dose journalière de 38 mg pour 100 g de poids du corps, per os.

La simple migration de la double liaison correspondait donc à l'apparition du pouvoir hypocholestérolémiant pour ce composé. Par la suite, la synthèse et les essais biologiques d'autres acides βγ-insaturés ont confirmé ces résultats, en montrant que le pouvoir hypocholestérolémiant était dû, dans ce cas, à la présence dans la molécule d'un groupement caractéristique :

$$R - CH = \underset{\underset{R'}{|}}{C} - CH_2 - COOH$$

Il nous faut remarquer que, du point de vue chimique, la préparation des acides βγ-insaturés à l'état pur est très difficile, car il se forme toujours un équilibre entre la forme αβ- et la forme βγ-insaturée. Cependant, d'après KON et LINDSTEADT (98), les composés obtenus comme βγ-insaturés ne contiennent pas plus de 15 à 20 % de la forme αβ-insaturée. Nous-mêmes, par des mesures d'absorption ultraviolette de ces substances, avons décelé un pourcentage de l'ordre de 10 à 20 % de forme αβ- dans les composés βγ-insaturés étudiés. La forme αβ- qui est la plupart du temps cristallisée a été pratiquement obtenue à l'état pur, ainsi que l'indiquent soit les points de fusion, soit les spectres d'absorption ultraviolets.

Notons également la très grande instabilité des acides βγ-insaturés, ce qui rend difficiles leurs essais biologiques. Ceci nous a incités à rechercher si quelques-uns de leurs dérivés cristallisés étaient actifs. Nous avons ainsi préparé l'amide de l'acide méthyl-3 pentène-3 oïque qui s'est montré beaucoup moins actif que l'acide libre. L'acétamide radioactif est d'ailleurs un précurseur du cholestérol dix fois moins actif que l'acétate de potassium (5) ; il ne serait transformé que dans une faible proportion en acide acétique

dans l'organisme animal. C'est pourquoi nous avons poursuivi les recherches dans ce domaine en utilisant soit le sel de sodium, soit le sel de calcium des acides étudiés qui présentent la même activité que l'acide libre et sont moins instables.

2 - Variation de l'activité des acides βγ-insaturés en fonction de leurs structures chimiques.

a) Influence de la nature des substituants.

Nous avons tout d'abord préparé des composés où la modification structurale ne portait que sur l'un des substituants du carbone n° 3, donc de structure générale :

$$R - CH = \underset{\underset{CH_3}{|}}{C} - CH_2 - COOH$$

où R est un radical carboné à chaîne linéaire ou ramifiée.

Nous avons expérimenté les acides suivants :

Méthyl-3 pentène-3 oïque $CH_3-CH=\underset{\underset{CH_3}{|}}{C}-CH_2-COOH$ (I)

Méthyl-3 hexène-3 oïque $CH_3-CH_2-CH=\underset{\underset{CH_3}{|}}{C}-CH_2-COOH$ (II)

Méthyl-3 heptène-3 oïque $CH_3-CH_2-CH_2-CH=\underset{\underset{CH_3}{|}}{C}-CH_2-COOH$ (III)

qui présentent une activité hypocholestérolémiante décroissante en fonction de l'allongement de la chaîne carbonée principale.

Administrés à des rats, à la même dose de 30 mg pour 100 g par jour, ils produisent, au bout de 30 jours d'expérience, une diminution du taux de cholestérol sanguin de l'ordre de :

(I) - 13 %
(II) - 9 %
(III) 0 %.

L'introduction d'une ramification sur la chaîne latérale R n'entraîne pas de variation particulière de l'activité hypocholestérolémiante.

Nous avons pu comparer les activités des acides à chaîne latérale linéaire et des acides à chaîne ramifiée.

Acides	Diminution du taux de cholestérol sanguin.
$CH_3-CH_2-CH=C(CH_3)-CH_2-COOH$	- 9 et - 10 %
$CH_3-CH(CH_3)-CH=C(CH_3)-CH_2-COOH$	- 11 et - 13 %
$CH_3-CH_2-CH_2-CH_2-CH=C(CH_3)-CH_2-COOH$	0 %
$CH_3-CH(CH_3)-CH_2-CH_2-CH=C(CH_3)-CH_2-COOH$	0 %

Cette inactivité des acides à chaîne carbonée principale dont la condensation en carbone est supérieure à C_6 s'explique peut-être à la suite des travaux de KEIL (94) qui ont mis en évidence l'existence d'une ω -oxydation des acides gras ramifiés de concentration en carbone supérieure à C_6 ; ces acides, administrés à des chiens per os peuvent être rejetés dans l'urine de ces animaux sous forme de diacides. D'après ces résultats, l'acide méthyl-3 heptène-3 oïque pourrait donc être dégradé en diacide saturé correspondant. Nous avons évidemment recherché, dans l'urine des animaux traités, si l'on pouvait déceler la présence d'un composé de cette série ; mais la quantité trop faible de substance ingérée (de 15 à 30 mg par animal) ne nous a pas permis de déceler un tel produit de transformation.

Avec les acides βγ-insaturés, nous constatons, pour les composés dont la longueur de la chaîne carbonée dépasse 6 atomes de carbone, un changement d'activité biologique, phénomène déjà observé dans de nombreux autres exemples (2, 50).

La préparation de composés où les deux substituants méthyle du carbone n° 3 de l'acide diméthyl-acrylique se trouvent remplacés par des radicaux différents nous a fourni des substances fortement hypocholestérolémiantes. C'est ainsi que nous avons obtenu les composés actifs suivants :

Acides		Diminution du taux de cholestérol sanguin
$CH_3-CH=\underset{\displaystyle C_2H_5}{\overset{\displaystyle |}{C}}-CH_2-COOH$	(éthyl-3 pentène-3 oïque)	- 20 %
$C_6H_5-CH=\underset{\displaystyle C_6H_5}{\overset{\displaystyle |}{C}}-CH_2-COOH$	(diphényl-3,4 butène-3 oïque)	- 13 %
$CH_3-CH=\underset{\displaystyle C_6H_4-OH}{\overset{\displaystyle |}{C}}-CH_2-COOH$	(p-hydroxy-phényl-3 pentène-3 oïque)	- 12 %
$=CH-COOH$	(cyclo-pentylidène acétique)	- 11 %
$-CH_2-COOH$	(cyclo-pentène-1 acétique)	- 17 %

Signalons que la forme αβ- de ces acides, sauf pour l'acide cyclo-pentène acétique, est pratiquement inactive. Ce fait est assez surprenant, du moins en ce qui concerne l'acide éthyl-3 pentène-2 oïque, $CH_3 - CH_2 - \underset{\displaystyle C_2H_5}{\overset{\displaystyle |}{C}} = CH - COOH$, car il a été montré

que les acides gras saturés substitués en β par un éthyle ne sont pratiquement pas dégradés dans l'organisme animal (95), alors que les acides gras substitués en β par un méthyle sont normalement utilisés. Nous pensions donc que le comportement de cet acide éthyl-3 pentène-2 oïque serait différent de celui de l'acide méthyl-3 pentène-2 oïque, en particulier, qu'il ne serait pas dégradé dans l'organisme et qu'il présenterait une activité égale à celle de son isomère βγ-insaturé. Or, cet acide αγ-insaturé est inactif et ne se retrouve pas dans l'urine des rats ayant reçu des doses massives de ce corps (500 à 600 mg de sel de calcium mélangé à la nourriture) ; ceci permet de penser que la non dégradation des acides gras saturés substitués en β par un groupement éthyle est due à une impossibilité de l'organisme d'effectuer la déshydrogénation en α de la fonction acide qui constitue la première phase de la dégradation des acides gras par β-oxydation (114).

Il faut rapprocher de ce fait l'inactivité comme hypocholestérolémiant des acides β-méthyl et β-éthyl cinnamiques où le remplacement du substituant méthyle par un groupement éthyle ne modifie pas l'activité.

Nous nous contenterons de préciser que, dans le groupe de l'acide cinnamique, la position du substituant par rapport à la fonction acide joue un grand rôle sur l'activité de ces composés ; ainsi, l'acide β-phényl-cinnamique,

$$C_6H_5 - \overset{C_6H_5}{\overset{|}{C}} = CH - COOH$$

est inactif, alors que l'acide α-phényl-cinnamique,

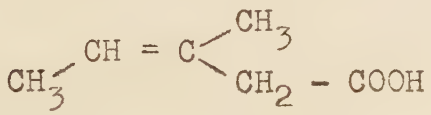
$$C_6H_5 - CH = \overset{C_6H_5}{\overset{|}{C}} - COOH$$

est actif comme hypocholestérolémiant.

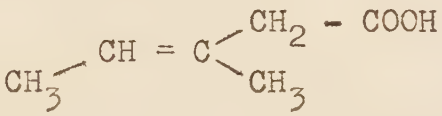
Ce même phénomène existe d'ailleurs dans la série des acides non aromatiques.

b) Influence de la forme stérique.

Nous n'avons pas tenu compte, dans les essais d'activité de ces substances, de la forme stérique des différents composés. Nous savons que l'existence d'une double liaison dans une molécule crée un plan de symétrie dans celle-ci, les différents substituants des deux carbones portant la double liaison pouvant se situer de part et d'autre de ce plan, ce qui permet l'existence de deux formes stéréoisomères cis et trans, suivant le schéma :



forme cis



forme trans

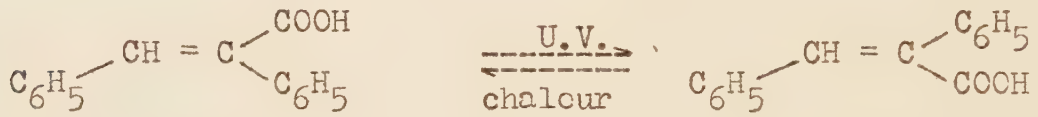
Or, on connaît la différence de comportement biologique des formes cis et trans de composés chimiques. En effet, les enzymes ont en général une stéréospécificité très marquée ; ainsi, pour la crotonase cristallisée, on a les activités relatives de :

100 pour l'hydratation de l'acide crotonique trans,

et de : 30 pour l'hydratation de l'acide crotonique cis (161).

L'étude biologique des isomères cis et trans dans la série des acides $\beta\gamma$-insaturés pose le problème de leur isolement à l'état pur qui, pour l'instant, n'est pas résolu. Mais nous avons voulu cependant rechercher l'influence de la forme stérique sur l'activité hypocholestérolémiante de composés proches de cette série. Nous nous sommes adressés pour cela à l'acide α-phényl-cinnamique qui peut être facilement obtenu par synthèse chimique sous la forme cis ou trans.

La condensation de l'aldéhyde benzoïque sur le phénylacétate de sodium en présence d'anhydride acétique à température assez élevée conduit à la forme trans, F. 172-173° C (136). Par irradiation ultraviolette en solution organique, on obtient la transformation pratiquement quantitative de la forme trans en forme cis, F. 137-138° C (165).



forme trans, F. 172-173° C — forme cis F. 137-138° C

Les résultats biologiques obtenus en administrant 30 mg par jour de chacun de ces composés à des groupes de 15 rats pendant 30 jours confirment l'existence d'une grande différence d'activité de ces deux formes.

Cholestérolémie (voir Tableaux 22 et 22bis p. 86 et 87)

Témoins	Traités (trans)	Traités (cis)
84 ± 0,9 mg %	71 ± 2,2 mg %	78 ± 1,7 mg %
activité relative	100	40

Ce résultat partiel nous permet de penser que le problème des formes stéréochimiques doit être étudié dans le cas des acides βγ-insaturés, ainsi que dans celui des acides αβ-insaturés dont les substituants en β ne sont pas symétriques.

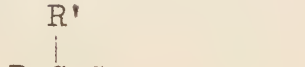
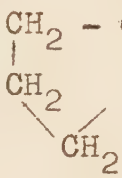
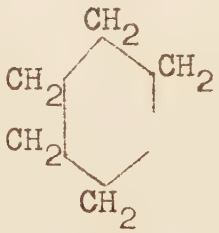
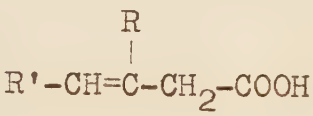
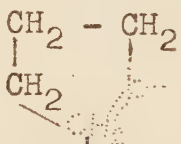
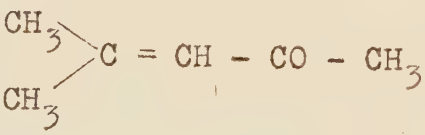
Nous n'avons qu'abordé ce problème ; il apportera certainement des résultats intéressants mais il est tout d'abord nécessaire de mettre au point une technique facilement utilisable pour la séparation et l'isolement des formes cis et trans dans cette série de composés organiques.

c) Tableau.

Voici, réunis dans un tableau, les résultats des essais biologiques effectués sur quelques composés appartenant à ces groupes chimiques, avant d'envisager le mode d'action des substances qui se sont révélées hypocholestérolémiantes.

Tableau 23.

Produit de référence : Acide phényl-éthyl acétique (36)		Cholestérolémie en mg % Témoins 79	Traités 69	Variation en % - 13
Type général	Substituant R =			
$R-C(CH_3)=CH-COOH$	CH_3-	79	85	+ 8
	C_2H_5-	82	84	+ 3
	C_6H_5-	81	80	- 1
	$CH_3-CH(CH_3)-CH_2-$	89	84	- 5
	$(CH_3)_2C=CH-CH_2-CH_2-$	80	79	- 1
$R-CH=C(CH_3)-CH_2-COOH$	CH_3-	80	68	- 15
	CH_3-CH_2-	79	72	- 9
	$CH_3-CH_2-CH_2-$	79	79	0
	$CH_3-CH(CH_3)-$	81	70	- 13
	$(CH_3)_2C=CH-CH_2-$	80	81	+ 1

Type général	R	R'	Cholestérolémie en mg % Témoins	Cholestérolémie en mg % Traités	Variation en %
	C_2H_5-	C_2H_5-	81	78	- 4
	C_6H_5-	C_2H_5-	89	95	+ 7
	C_6H_5-	C_6H_5-	82	80	- 3
			81	72	- 11
			81	75	- 7
	C_2H_5-	CH_3-	88	71	- 19 (15 mg/j)
	C_6H_5-	C_6H_5-	83	72	- 13
	$HO-C_6H_4-$	CH_3-	81	71	- 12
			81	68	- 16
	CH_3-CH- CH_3	$CH_3 > CH-CH_2-$ CH_3	82	81	- 1
Composés divers :					
			89	101	+ 13
$CH_3 - CH(CH_3) - CH_2 - CH(CH_3) - CH_2 - COOH$			89	88	- 1

4°) MECANISME D'ACTION.

1 - Différence d'activité des acides αβ- et βγ-insaturés.

a) Comparaison de la vitesse de dégradation in vitro.

La très grande différence d'activité entre les acides αβ- et βγ-insaturés dont un exemple frappant est constitué par le couple :

Action sur la cholestérolémie

- Acide méthyl-3 pentène-2 oïque,

$$CH_3 - CH_2 - \overset{CH_3}{\underset{|}{C}} = CH - COOH \qquad + 3\ \%$$

- Acide méthyl-3 pentène-3 oïque,

$$CH_3 - CH = \overset{CH_3}{\underset{|}{C}} - CH_2 - COOH \qquad - 13\ \%$$

peut provenir d'un écart dans la durée de vie moyenne de ces substances dans l'organisme. En effet, pour obtenir l'inhibition d'une des phases de la biosynthèse du cholestérol, il faut tout d'abord que l'inhibiteur atteigne le lieu de la synthèse et ensuite que soit maintenue dans l'organisme une concentration en inhibiteur suffisamment importante. Or il existe un enzyme, l'hydrase des acides gras insaturés (118) qui hydrate la double liaison 2,3 des acides gras αβ-insaturés combinés au coenzyme A (75); cette réaction constitue la première étape dans la dégradation de ces acides. On peut donc penser que la vitesse d'hydratation de la double liaison αβ- de l'acide méthyl-3 pentène-2 oïque est beaucoup plus rapide que celle de la double liaison βγ- de l'acide méthyl-3 pentène-3 oïque, ce qui entraîne une durée de vie moyenne beaucoup plus faible de l'isomère αβ-insaturé dans l'organisme animal ; la concentration nécessaire pour obtenir l'inhibition ne serait pas atteinte dans ce cas.

Nous avons donc recherché in vitro quel était, en présence de coupes de foie, le comportement de ces deux composés, l'acide méthyl-3 pentène-2 oïque où la double liaison est en αβ et qui ne présente pas d'activité hypocholestérolémiante et l'acide méthyl-3 pentène-3 oïque où la double liaison est en βγ et qui présente une activité hypocholestérolémiante.

Technique :

Des rats de 100 g, nourris au moyen du régime normal standard, sont sacrifiés par décapitation. Le foie, rapidement prélevé, est soigneusement rincé avec une solution de KREBS-RINGER, puis coupé en fines lamelles de 0,2 à 0,3 mm d'épaisseur qui sont immédiatement submergées dans le milieu d'incubation.

On répartit alors les coupes dans différentes nacelles en pyrex de manière à avoir 600 mg de foir par nacelle (les coupes des différents foies ayant été au préalable mélangées pour obtenir une répartition homogène). Chaque nacelle contient 10 cm3 de tampon phosphate de KREBS-RINGER à pH 7,4 ainsi que des quantités variables (de 1 à 5 mg) de l'acide à étudier sous forme de sel de sodium. L'incubation dure 3 h. à 37° C en présence d'oxygène avec agitation.

On a ainsi, pour chaque acide (acides diméthyl-acrylique, méthyl-3 pentène-3 oïque et méthyl-3 pentène-2 oïque) 5 flacons contenant : 1, 2, 3, 4, 5 mg de chaque corps.

La réaction est arrêtée au bout de 3 h. par addition de 1 cm3 d'acide sulfurique à 10 %. Le milieu d'incubation est décanté, les coupes de foie soigneusement rinçées à l'eau acidulée et ces solutions combinées extraites à l'acétate d'éthyle. Après lavage à l'eau distillée jusqu'à neutralité de la phase

organique, le solvant est évaporé sous vide ; le résidu sec repris avec le minimum d'alcool éthylique est alors déposé sur un papier de chromatographie SCHLEICHER et SCHULL.

Un témoin, obtenu par extraction de 1 mg du même acide, après incubation de 3 h. à 37° C dans le milieu tampon seul, est déposé sur la même feuille (la quantité de 1 mg a été déterminée expérimentalement comme étant la plus petite quantité de composé qui pouvait être décelée par chromatographie dans ces conditions opératoires).

La chromatographie est alors effectuée au moyen du solvant: butanol saturé avec NH_4OH 1,5 N (142). Après séchage, le chromatogramme est révélé au moyen d'une solution de vert de bromocrésol. Les R_f suivants ont été observés dans ce cas pour les trois acides :

$(CH_3)_2C=CH-COOH$ Acide ββ-diméthyl-acrylique 0,30 (I)

$CH_3-CH_2-C(CH_3)=CH-COOH$ Acide méthyl-3 pentène-2 oïque 0,45 (II)

$CH_3-CH=C(CH_3)-CH_2-COOH$ Acide méthyl-3 pentène-3 oïque 0,40 (III).

Remarque :

Chacun de ces trois acides laisse une tache faible au point de départ.

Nous avons résumé, dans le tableau ci-après, les résultats des différentes expériences comprenant chacune 5 essais (concentration de 1 à 5 mg) dont les extraits ont été chromatographiés côte à côte, sur la même feuille.

	Témoin (1 mg)	1 mg	2 mg	3 mg	4 mg	5 mg
(I)	+	0	0	⊕	+	++
(II)	+	0	0	+	+	++
(III)	+	⊕	+	++	++	+++

Les croix indiquent l'intensité de la tache correspondant au corps étudié après révélation au vert de bromocrésol.

En présence de coupes de foie, en tampon phosphate bicarbonaté de KREBS, l'acide αβ-insaturé est rapidement dégradé, alors que l'acide βγ-insaturé n'est pratiquement pas atteint durant le temps d'incubation. En fait, on retrouve par chromatographie sur papier une partie de l'acide βγ-insaturé, alors que l'on ne décèle plus aucune trace d'acide αβ-insaturé, après 3 h. dans ce milieu à 37°.

Après avoir vérifié la différence de comportement des deux isomères précédents, nous avons étudié le phénomène d'inhibition de l'utilisation de l'acide diméthyl-acrylique pour la synthèse du cholestérol dans les homogénats de foie. En effet, BLOCH et RITTENBERG (19) ont montré que l'acide diméthyl-acrylique radioactif mis à incuber avec des homogénats de foie se retrouvait dans le cholestérol qui, de ce fait, était radioactif. Dans nos conditions expérimentales, l'acide diméthyl-acrylique, ajouté à un homogénat de foie, disparaît rapidement du milieu. Si l'on ajoute en même temps à cet homogénat l'un des acides précédents, on diminue la dégradation de l'acide diméthyl-acrylique. Cependant, dans le cas de l'acide αβ-insaturé, la séparation chromatographique des deux acides permet de constater qu'il y a une égale disparition des deux acides diméthyl-acrylique et méthyl-3

pentène-2 oïque, alors que, dans le cas de l'acide méthyl-3 pentène-3 oïque, la quantité d'acide diméthyl-acrylique détruite est beaucoup plus faible et l'acide βγ-insaturé n'est pratiquement pas touché.

Il est évidemment difficile de chiffrer ces différences, car la méthode chromatographique est trop imprécise ; mais la surface des taches fournit une approximation suffisante pour établir une très nette différence.

Il semble donc que les acides βγ-insaturés ralentissent la vitesse d'utilisation d'un des précurseurs naturels du cholestérol, l'acide diméthyl-acrylique, ce qui explique leur action hypocholestérolémiante.

Ceci est à rapprocher des résultats de STERN et DEL CAMPILLO qui ont mis en évidence un fait similaire avec la crotonase cristallisée (160), enzyme qui catalyse l'hydratation de la double liaison de l'acide crotonique. Ces auteurs ont montré que l'acide crotonique, $CH_3 - CH = CH - COOH$, était hydraté en acide β-hydroxylé en présence de crotonase, suivant la réaction équilibrée :

$$CH_3\text{-}CH{=}CH\text{-}COOH \quad \underset{-\ H_2O}{\overset{+\ H_2O}{\rightleftharpoons}} \quad CH_3\text{-}CH(OH)\text{-}CH_2\text{-}COOH$$

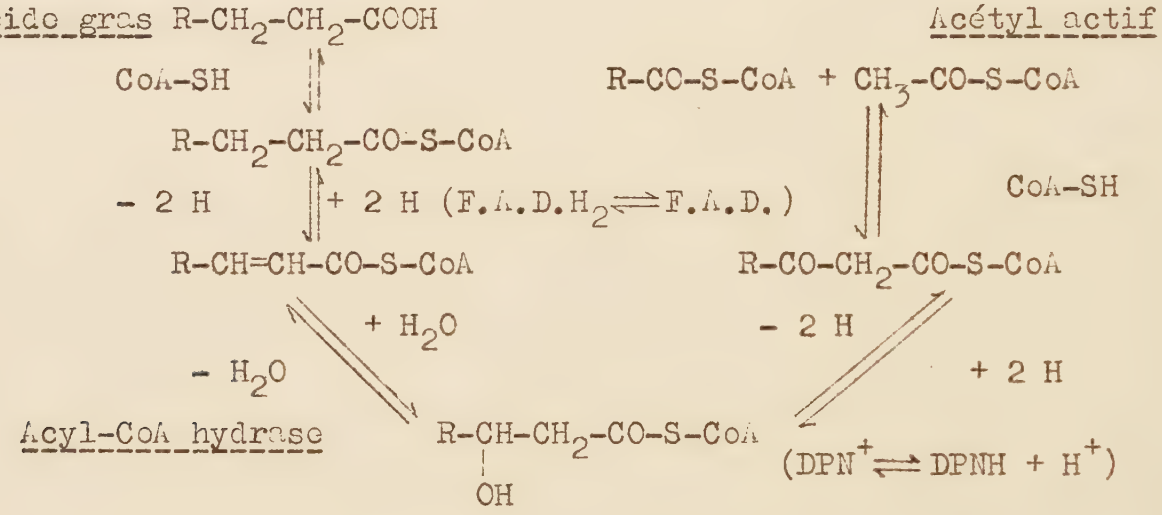
Ils ont aussi remarqué que l'adjonction au mélange de l'isomère βγ-insaturé, l'acide vinyl-acétique, $CH_2{=}CH\text{-}CH_2\text{-}COOH$, diminuait fortement la vitesse d'hydratation de l'acide crotonique.

A partir de ces résultats, nous pouvons suggérer qu'il existe une compétition entre les acides αβ - et βγ-insaturés en présence de systèmes enzymatiques responsables de la synthèse du cholestérol. L'acide βγ-insaturé étant très lentement métabolisé

entraîne une diminution de la vitesse d'utilisation de l'acide diméthyl-acrylique, d'où l'effet hypocholestérolémiant de ces composés.

b) Comparaison de l'action sur les acides gras hépatiques.

Mais la crotonase ou du moins un enzyme proche, l'acyl CoA hydrase, présent dans les mitochondries des cellules hépatiques, et qui catalyse l'hydratation de la double liaison des acides gras αβ-insaturés (176) intervient dans la synthèse ou la dégradation des acides gras suivant le cycle proposé par LYNEN (114) :



L'acétyl actif a été identifié comme étant un acétyl mercaptan (116), combinaison du radical acétyl avec le coenzyme A.

Ainsi les composés inhibant ce système enzymatique doivent entraîner une diminution de la synthèse des acides gras et, par là, abaisser la teneur en graisses du foie.

Expérimentalement, nous avons vérifié si cette différence d'action existait entre les deux composés : acides méthyl-3 pentène-2 oïque et méthyl-3 pentène-3 oïque. Pour cela, nous

avons effectué la détermination de la teneur en acides gras du foie des animaux après administration de 30 mg par jour du composé durant 30 jours.

L'expérience a porté sur 15 rats témoins et 15 traités pour chacun des corps étudiés. Les acides gras hépatiques ont été groupés par 5 pour effectuer les déterminations de poids et d'indice d'iode.

Acide méthyl-3 pentène-2 oïque.

Cholestérolémie - Témoins : 82 mg % - Traités : 84 mg %.

	Témoins		Traités	
	Acides gras (en g/100 g foie frais)	Indice d'I_2	Acides gras (en g/100 g foie frais)	Indice d'I_2
	3,80	127	4,20	137
	4,10	142	4,10	118
	4,00	139	3,90	121
Moy.	4,0 g %	136	4,1 g %	125

Acide méthyl-3 pentène-3 oïque.

Cholestérolémie - Témoins : 80 mg % - Traités : 68 mg %

	Témoins		Traités	
	3,80	132	2,90	78
	4,00	125	2,80	103
	3,90	129	2,90	67
Moy.	3,9 g %	128	2,9 g %	81

Acide diméthyl-acrylique.

Cholestérolémie - Témoins : 78 mg % - Traités : 80 mg %

	Témoins		Traités	
	3,80	117	4,20	130
	4,10	129	4,10	121
	4,00	114	4,90	116
Moy.	4,0 g %	120	4,4 g %	123

Il était intéressant de faire l'essai avec l'acide diméthyl-acrylique car BERNHARD (13) a montré que l'acide ββ-diméthyl-acrylique n'a aucune action sur la synthèse des acides gras et l'oxydation de l'acétate chez le rat.

Ces résultats nous permettent de penser que la synthèse des acides gras est perturbée par les acides βγ-insaturés. Il en est de même pour la déshydrogénation.

Nous retrouvons ici aussi la grande différence d'activité entre les acides αβ- et βγ-insaturés.

Nous devons rapprocher l'effet sur la synthèse des acides gras hépatiques de l'action lipotrope du phytol que BERNHARD et RITZEL (12) considèrent comme une conséquence du freinage par le phytol de la synthèse hépatique des graisses.

2 - Etude du mécanisme d'action de quelques-uns des acides βγ-insaturés actifs comme hypocholestérolémiants.

a) Etude de l'action hypocholestérolémiante dans d'autres conditions expérimentales.

Tous les résultats que nous avons obtenus avec un mode opératoire particulier correspondent-ils à un fait physiologique bien défini ? Existe-t'il en fait une inhibition de la biosynthèse du cholestérol ?

C'est une publication de ISLER et Collaborateurs (67) qui nous permet d'apporter ici un résultat positif dans ce sens. Ces auteurs ont en effet étudié l'intégration de l'acétate de potassium 1-^{14}C dans le cholestérol en présence d'homogénat de foie en milieu de KREBS-RINGER, auquel étaient ajoutés les éléments activateurs des réactions enzymatiques (DPNH, etc...).

Dans ces conditions, l'incubation de l'acétate de potassium 1-^{14}C fournit, au bout de 3 h., un cholestérol renfermant une partie importante de la radioactivité apportée. L'adjonction au milieu de certaines substances provoque une diminution de ce processus ; ainsi, le cholestérol est moins radioactif lorsque l'on ajoute à ce milieu soit un précurseur direct comme l'acide mévalonique, soit un inhibiteur comme l'acide méthyl-3 pentène-3 oïque utilisé par ces auteurs.

Ils ont trouvé que si l'on donne la valeur 100 à l'incorporation du carbone radioactif dans le cholestérol pour les expériences témoins, la valeur obtenue pour l'incorporation en présence d'acide méthyl-3 pentène-3 oïque est d'environ 80, ce qui correspond à une inhibition de l'ordre de 20 % de ce processus. Nous pouvons comparer cette valeur à celle obtenue dans les mêmes conditions avec l'acide phényl-éthyl-acétique, valeur qui se situe autour de 18 % d'inhibition.

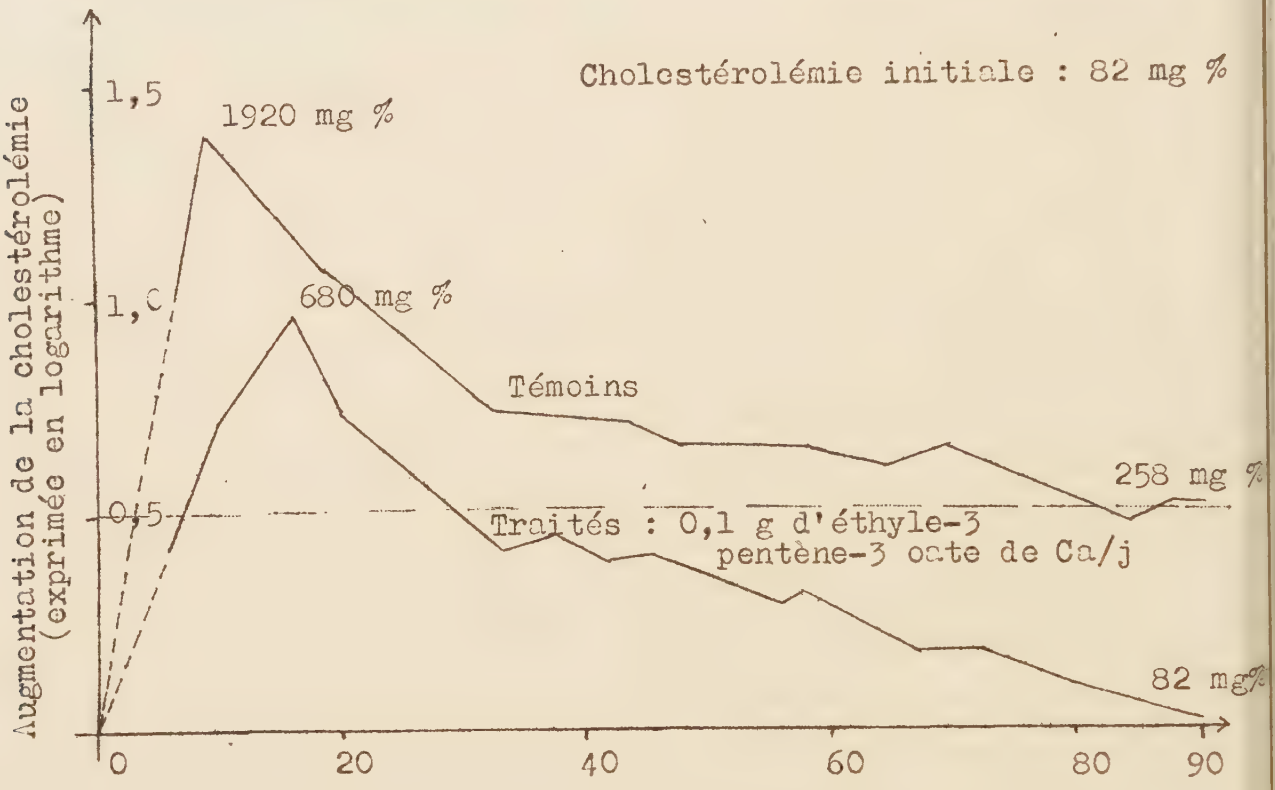
Une deuxième confirmation nous a été apportée par le Dr. G. COSTE (*) qui a bien voulu étudier expérimentalement l'influence de l'acide éthyl-3 pentène-3 oïque sur la fixation du cholestérol dans l'aorte du lapin recevant un régime athérogène.

L'expérience a porté sur des lapins de poids moyen 1,8 Kg, recevant pendant 95 jours un régime normal auquel on ajoute 0,5 g de cholestérol par animal chaque jour.

Les animaux sont divisés en 2 groupes : l'un des groupes reçoit en plus 0,1 g d'éthyl-3 pentène-3 oate de calcium (ce sel étant plus stable que l'acide libre).

(*) Communication personnelle.

Le cholestérol sanguin, dosé deux fois par semaine, permet de constater une très nette influence de l'acide éthyl-3 pentène-3 oïque sur la cholestérolémie qui est plus basse chez les animaux traités que chez les témoins durant toute l'expérience.



De plus, lorsque les animaux sont sacrifiés après trois mois d'expérimentation et que l'aorte est prélevée depuis le coeur jusqu'au diaphragme, l'examen de l'artère ne montre aucune sclérose importante chez les traités, contrairement aux témoins dont la tunique interne de l'aorte présente de nombreuses concrétions blanchâtres caractéristiques de l'athérosclérose expérimentale.

Cette expérience apporte donc, par une autre méthode, une confirmation de l'effet hypocholestérolémiant de l'acide éthyl-3 pentène-3 oïque et met bien en évidence la différence existant entre le mode d'action de l'acide éthyl-3 pentène-3 oïque, hypo-

cholestérolémiant anti-athéromateux, et de l'acide phényl-éthyl-acétique, hypocholestérolémiant ne présentant pas de propriétés anti-athérogènes (105).

Ce qui est d'ailleurs remarquable dans ce résultat, c'est l'effet sur la cholestérolémie dans les conditions opératoires utilisées. En effet, nous avions trouvé que ce composé était un inhibiteur de la biogénèse du cholestérol endogène ; or, dans cette expérience, la plus grosse partie du cholestérol a une origine exogène ; en fait, cet apport important de cholestérol alimentaire doit ralentir la synthèse endogène de cette molécule (39) et provoquer une synthèse accrue des graisses neutres et des phospho-lipides. Or, dans de telles conditions, l'acide éthyl-3 pentène-3 oïque s'est révélé hypocholestérolémiant ; il fallait donc, pour expliquer cette divergence, envisager une action secondaire de ce composé, au niveau de l'absorption intestinale du cholestérol.

b) Relation entre l'action sur les acides gras hépatiques et l'action hypocholestérolémiante.

- Mécanisme d'absorption du cholestérol.

Pour expliquer et comprendre cette action, il faut préciser les dernières hypothèses concernant l'absorption et l'assimilation intestinale du cholestérol. Tout d'abord, signalons un fait important qui a été mis en évidence par GLOVER et GREEN (69) et confirmé par d'autres auteurs (172, 167) : bien que la majeure partie du cholestérol exogène absorbé passe dans la lymphe sous forme d'esters du cholestérol, l'estérification du cholestérol contenu dans l'intestin n'est pas une étape obligatoire pour son absorption par la paroi intestinale. Ainsi, le

cholestérol libre dans la lumière de l'intestin pénètre dans la muqueuse intestinale par un processus qui ne demande pas l'intervention de la cholestérol-estérase. Ce cholestérol ne reste pas longtemps dans les cellules de la paroi intestinale puisque du cholestérol 4-^{14}C, administré per os à des rats, apparaît très rapidement dans la lymphe ; mais il se trouve dilué par du cholestérol non radioactif de provenance endogène. Pour expliquer ce phénomène (167), ces auteurs envisagent que le transfert du cholestérol libre exogène dans la lymphe comprend comme phase intermédiaire son passage dans les cellules intestinales qui sont très riches en cholestérol libre et dans lesquelles ce cholestérol absorbé se mélange avec le cholestérol libre de la paroi intestinale. Cette dilution s'effectue donc avant l'estérification qui est nécessaire pour le transfert de ce cholestérol dans la lymphe.

Le mécanisme de l'absorption du cholestérol serait donc le suivant (166) :

Le cholestérol libre et estérifié ainsi que les graisses alimentaires arrivent dans l'intestin grêle où ils sont mélangés au cholestérol endogène provenant de la bile et d'autres sécrétions. Les esters du cholestérol et les glycérides sont alors hydrolysés et les produits ainsi obtenus, grâce à la présence des sels biliaires, pénètrent dans la muqueuse intestinale où ce cholestérol libre est alors mélangé avec le cholestérol libre présent dans la muqueuse. Ce transfert a ainsi tendance à augmenter les réserves en cholestérol libre de la muqueuse, ce qui crée des conditions favorables à l'estérification du cholestérol puisqu'il s'y trouve en présence de

sels biliaires, d'acides gras et qu'il existe en outre dans les cellules de la paroi intestinale une quantité importante de cholestérol-estérase. Tous ces facteurs concourent à favoriser une synthèse accrue d'esters du cholestérol qui peuvent alors passer dans les chylifères. Ces esters ne sont pas déversés seuls dans la lymphe mais y sont transférés en même temps que des triglycérides, des phospholipides, du cholestérol non estérifié et des protéines. Toutes ces substances existent d'ailleurs ensemble comme constituants des chylomicrons qui représentent une part importante de la lipémie post-prandiale. La structure intime exacte de ces chylomicrons est encore inconnue, mais un fait est certain, les molécules de cholestérol libre jouent un rôle essentiel dans l'édification de ces gouttelettes particulières.

Cette hypothèse permet de comprendre l'existence d'un phénomène observé par BOLLMAN et FLOCK (22), à savoir l'augmentation des phospholipides et des graisses neutres de la lymphe durant l'absorption du cholestérol, alors qu'inversement, lorsque des graisses seules sont ingérées, il y a une augmentation du contenu en cholestérol de la lymphe.

- Action de l'acide éthyl-3 pentène-3 oïque sur les constituants des lipides hépatiques.

Nous avons vu que les graisses et les phospholipides sont nécessaires pour l'absorption intestinale du cholestérol, ou plutôt pour son passage dans la lymphe. Or dans les conditions imposées par l'expérience sur le lapin, le régime contient environ 3 % de cholestérol avec une teneur en graisses neutres faible; la présence de doses importantes de cholestérol dans ce régime impose donc à l'organisme une synthèse accrue des éléments dont

il a besoin pour l'absorption du cholestérol, c'est à dire des phospholipides et des graisses. Or, nous avions constaté dans nos expériences antérieures que certains acides βγ-insaturés diminuaient fortement la teneur en acide gras du foie des rats. Il en est de même avec l'acide éthyl-3 pentène-3 oïque dont nous avons groupé les effets sur les constituants lipidiques du foie dans le tableau suivant :

Tableau 24 - Acide éthyl-3 pentène-3 oïque.

L'expérience comporte deux groupes de 15 rats maintenus au régime à 10 % de saindoux durant 30 jours. Chaque rat du groupe traité reçoit, per os, 15 mg par jour d'acide éthyl-3 pentène-3 oïque.

Cholestérolémie (effectué sur les sérums mélangés de 7 rats).

Témoins		Traités	
Cholestérol total	Cholestérol libre	Cholestérol total	Cholestérol libre
83 mg %	12 mg %	70 mg %	10 mg %
81	11	68	10
% d'abaissement :		- 16 %	- 13 %

Cholestérol hépatique total

Témoins	Traités
2,80 mg/g	2,75 mg/g
3,45	2,05
3,20	2,15
2,55	1,97
2,65	3,05
3,05	1,82
3,27	2,27
2,87	2,98
3,16	2,02
2,98	2,66
moyenne : 3,0 mg/g	2,4 mg/g
	% d'abaissement : - 20 %

Cholestérol hépatique libre

Valeur moyenne obtenue sur 5 foies soigneusement lavés à l'eau et qui ont été broyés ensemble en présence d'alcool méthylique/méthylal, suivant la technique de DELSAL pour en extraire les lipides totaux ; le cholestérol libre et estérifié a été dosé sur cet extrait.

Témoins		Traités	
Cholestérol total	Cholestérol libre	Cholestérol total	Cholestérol libre
3 mg/g	2 mg/g	2,4 mg/g	1,9 mg/g
% d'abaissement		- 20 %	- 5 %

Acides gras hépatiques

	Témoins	Traités
Valeur moyenne	4 g %	2,8 g %
Indice d'iode	132	98

En considérant l'abaissement de la teneur en acides gras insaturés du foie, ainsi que la diminution de la quantité d'ester du cholestérol du sérum et du foie, nous pouvons supposer que l'acide éthyl-3 pentène-3 oïque crée un déficit en acides gras insaturés nécessaires à la mobilisation du cholestérol.

Ces faits nous permettent de concevoir comment le mécanisme d'absorption du cholestérol libre du régime peut être perturbé. Dans les conditions expérimentales utilisées pour les essais sur le lapin, l'organisme de ces animaux recevant de l'acide éthyl-3 pentène-3 oïque ne peut plus synthétiser une quantité suffisante d'éléments nécessaires à la formation des chylomicrons, ce qui diminue les possibilités d'absorption du cholestérol.

L'hypocholestérolémie observée chez les rats traités par les acides βγ-insaturés est la résultante de deux actions distinctes de ces composés :

- Inhibition de la synthèse endogène du cholestérol,
- Inhibition de la synthèse endogène des graisses,

ce qui a pour conséquence de diminuer la réserve de l'organisme en cholestérol ainsi que la mobilité de ce composé par suite du manque de graisses insaturées.

- Variations de l'effet sur le cholestérol et les acides gras hépatiques en fonction de la structure.

Une série de faits permet de montrer que ces deux processus concourent à la création de l'hypocholestérolémie. Pour cela, comparons l'action de trois composés, très proches l'un de l'autre : les acides méthyl-3 pentène-3 oïque, méthyl-3 pentène-2 oïque et l'amide de l'acide méthyl-3 pentène-3 oïque.

Chacun des deux acides a été administré à la dose de 30 mg par jour, pendant 30 jours ; l'amide à la dose de 35 mg par jour, pendant le même temps. La cholestérolémie, la valeur du cholestérol et des acides gras hépatiques ont été groupées dans les tableaux suivants :

Tableau 25.

Cholestérolémie (Cf. tableaux 8 p. 70, 11 p. 75, 10 p.74)

	Témoins	Traités	Variation en %
Acide méthyl-3 pentène-2 oïque	82 mg %	84 mg %	+ 3 %
Amide de l'acide méthyl-3 pentène-3 oïque	82	78	- 5 %
Acide méthyl-3 pentène-3 oïque	80	68	- 15 %

Cholestérol hépatique (en mg/g foie frais)
(Cf. tableaux 26 p.115 et 27 p. 116)

Témoins	$2,4 \pm 0,1$ mg/g $2,4 \pm 0,1$ mg/g	
Acide méthyl-3 pentène-2 oïque	$2,6 \pm 0,2$ mg/g	0 %
Amide de l'acide méthyl-3 pentène-3 oïque	$1,9 \pm 0,1$ mg/g	- 20 %
Acide méthyl-3 pentène-3 oïque	$1,4 \pm 0,1$ mg/g	- 40 %

Acides gras hépatiques (en g/100 g foie frais)
(Cf. tableau 28 p. 117)

Témoins	4 g %	
Indice d'iode :	128-136	
Acide méthyl-3 pentène-2 oïque	4,1 g %	
Indice d'iode :	125	0 %
Amide de l'acide méthyl-3 pentène-3 oïque	3,80 g %	
Indice d'iode	125	- 5 %
Acide méthyl-3 pentène-3 oïque	2,90 g %	
Indice d'iode	81	- 25 %

Tableau 26 - Cholestérol hépatique (en mg/g foie frais)

Acide méthyl-3 pentène-2 oïque
(30 mg/jour pendant 30 jrs)

Témoins	Traités
2,02 mg/g	2,98 mg/g
2,04	1,42
2,55	2,93
2,52	2,86
1,74	1,96
2,37	2,48
2,58	2,02
2,38	2,26
2,71	3,41
2,71	3,02
3,57	2,62
2,43	2,62
2,38	2,80
1,64	3,04
2,66	3,13
moyenne : 2,42 $\pm$ 0,1 mg/g	2,65 $\pm$ 0,15 mg/g

Tableau 27 - Cholestérol hépatique (en mg/g foie frais)

Témoins	Traités I Amide de l'acide méthyl-3 pentène-3 oïque (35 mg/jour pendant 30 j)	Traités II Acide méthyl-3 pentène-3 oïque (30 mg/jour pendant 30j)
2,18 mg/g	2,07 mg/g	1,32 mg/g
2,32	1,95	1,00
2,28	2,09	1,15
2,98	1,95	1,05
2,06	2,03	1,72
3,08	1,81	1,29
2,68	1,97	1,47
2,56	1,86	1,74
2,44	2,09	1,50
2,18	1,87	1,34
2,04	1,96	1,53
2,29	2,04	1,90
2,08	1,60	1,31
2,88	1,74	1,70
2,40	1,98	2,00
2,44 mg/g	1,93 mg/g	1,47 mg/g

En tenant compte de la dispersion des valeurs, les résultats s'expriment sous la forme :

Témoins : $2,4 \pm 0,1$ mg/g

Amide de l'acide méthyl-3 pentène-3 oïque : $1,9 \pm 0,1$ mg/g

Acide méthyl-3 pentène-3 oïque : $1,4 \pm 0,1$ mg/g.

Tableau 28 - Acides gras hépatiques
(en g/100 g foie frais)

Acide méthyl-3 pentène-2 oïque : voir p. 104.

Amide de l'acide méthyl-3 pentène-3 oïque :

Les foies sont groupés par 5 pour ces déterminations.

Témoins		Traités	
Acides gras	Indice d'I_2	Acides gras	Indice d'I_2
3,8 g %	132	3,8 g %	130
4,0	125	3,7	129
3,9	129	3,8	117
4,0 g %	128	3,8 g %	127

Acide méthyl-3 pentène-3 oïque : voir p. 104.

L'acide méthyl-3 pentène-2 oïque ne crée aucune diminution du cholestérol et des acides gras hépatiques, ce qui est en accord avec son inactivité comme hypocholestérolémiant.

L'amide de l'acide méthyl-3 pentène-3 oïque qui est très faiblement hypocholestérolémiant (- 5 %) provoque une diminution de 21 % de la teneur en cholestérol du foie mais n'agit pratiquement pas sur sa teneur en acides gras.

L'acide méthyl-3 pentène-3 oïque, fortement hypocholestérolémiant (- 15 %), produit une diminution de 38 % du cholestérol hépatique et de 29 % des acides gras du foie.

Ainsi, pour obtenir l'effet hypocholestérolémiant maximum, les acides βγ-insaturés doivent agir sur les deux processus : synthèse du cholestérol et synthèse des acides gras.

Toutefois, certains composés dans la série des acides βγ-insaturés qui créent une diminution importante des acides gras hépatiques n'ont pratiquement pas d'action hypocholestérolémiante. C'est le cas, par exemple, de l'acide méthyl-3 heptène-3 oïque dont les effets sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 29 - Acide méthyl-3 heptène-3 oïque

$$CH_3 - CH_2 - CH_2 - CH = \overset{\overset{CH_3}{|}}{C} - CH_2 - COOH$$

- 30 mg/jour pendant 26 jours.

Cholestérolémie (en mg/p. 100 cm3) (Voir tableau 13 p. 77)

Témoins : $79 \pm 1,7$ mg %

Traités : $79 \pm 1,6$ mg %

Cholestérol hépatique (en mg/g foie frais)

Témoins	Traités
2,18 mg/g	2,02 mg/g
2,32	2,04
2,28	2,55
2,78	2,52
2,06	1,94
2,08	2,37
2,68	2,58
2,56	2,38
2,44	1,71
2,18	2,03
2,04	2,38
2,29	2,06
2,08	2,24
2,88	2,17
2,40	2,61
moyenne : $2,3 \pm 0,1$ mg/g	$2,2 \pm 0,1$ mg/g

Acides gras hépatiques (en g/100 g foie frais)

Les foies des rats ont été groupés par 5 pour cette détermination.

Témoins		Traités	
Acides gras	Indice d'I_2	Acides gras	Indice d'I_2
3,86 g %	114	3,02 g %	81
4,03	103	2,93	92
4,02	108	3,12	85
3,97 g %	108	3,02 g %	86
Variation en % :		- 24 %	- 20 %

c) Action de l'acide éthyl-3 pentène-3 oïque sur la lipémie post-prandiale.

Si les acides βγ-insaturés diminuent l'utilisation des acides gras pour l'estérification du cholestérol, ils doivent certainement agir sur la mobilité du cholestérol, c'est à dire sur ses possibilités de mise en circulation à partir des tissus. C'est pourquoi nous avons étudié l'effet de l'acide éthyl-3 pentène-3 oïque sur la cholestérolémie et la lipémie post-prandiales.

Pour cela, 5 rats, de poids moyen 180 g, provenant d'un lot de 20 rats qui avaient déjà reçu, pendant 30 jours, 30 mg par jour d'acide éthyl-3 pentène-3 oïque, ainsi que 5 rats témoins provenant d'un lot de 20 rats témoins de cette expérience ont été mis à jeun pendant une période de 36 h. (le traitement à l'acide éthyl-3 pentène-3 oïque étant maintenu pendant le jeûne).

Ensuite, nous leur avons fait absorber, en l'espace d'1 h., 10 g d'aliments (à 10 % de saindoux) par animal. Puis, nous les avons laissés 2 h.30 au repos et nous les avons sacrifiés par décapitation.

Le sang a été recueilli pour la mesure de la cholestérolémie. Le foie, rapidement prélevé, a été soigneusement lavé à l'eau avant l'extraction du cholestérol.

Les résultats obtenus ont été groupés dans le tableau suivant :

Tableau 30 : Cholestérol sanguin.

Cholestérolémie normale (15 rats après un jeûne de 10 h.)

Témoins	Traités
81 mg %	67 mg %

Cholestérolémie post-prandiale (2 h.30 après ingestion de 10 g d'aliments)

Témoins	Traités
94 mg %	72 mg %
92	73
96	71
88	67
85	72
moyenne : 91 mg %	71 mg %

Cholestérol hépatique.

Cholestérol hépatique normal (15 rats après un jeûne de 10 h.)

Témoins	Traités
2,90 mg/g foie frais	2,20 mg/g foie frais

Cholestérol hépatique (2 h.30 après ingestion de 10 g d'aliments)

Témoins	Traités
2,16 mg/g	2,35 mg/g
2,22	2,25
2,60	2,60
2,80	2,10
2,45	2,17
moyenne : 2,45 mg/g foie frais	2,30 mg/g foie frais

Les moyennes nous fournissent les variations :

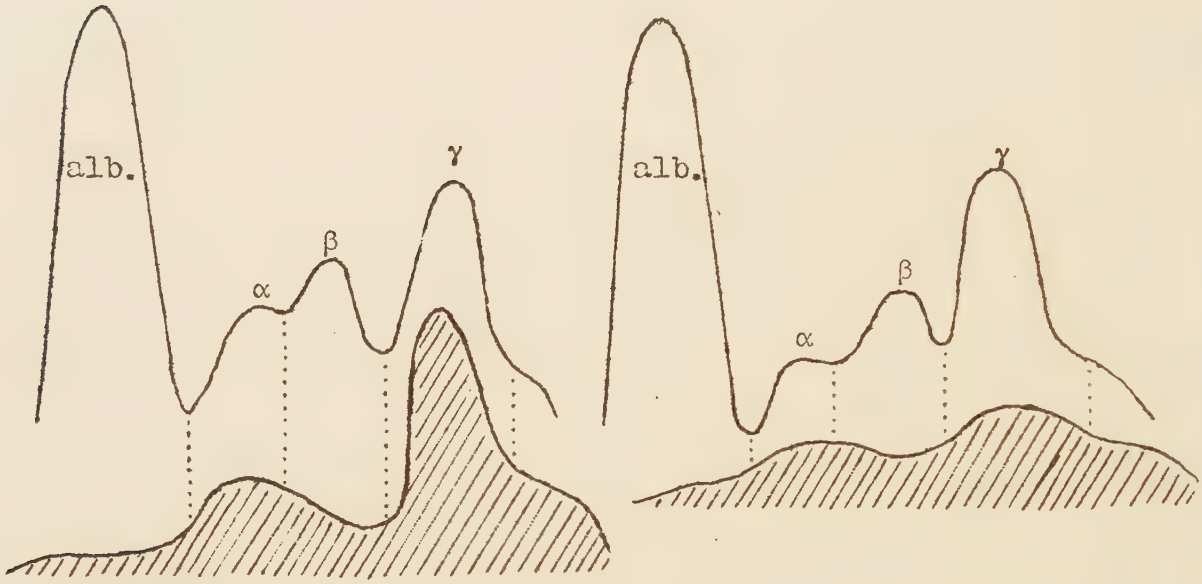
- de la cholestérolémie : + 10 mg % chez les animaux témoins,
  + 4 mg % chez les animaux traités,
- et du cholestérol hépatique :
  - 0,45 mg/g chez les animaux témoins
  + 0,10 mg/g chez les animaux traités.

On constate donc un affaiblissement très net de l'hypercholestérolémie consécutive à la digestion chez les animaux traités, sans doute par diminution de la possibilité de mobilisation du cholestérol hépatique dont la concentration ne varie pas chez ces mêmes animaux.

Cet affaiblissement de la lipémie post-prandiale est d'ailleurs clairement visible sur les sérums des animaux ainsi préparés : fortement lactescent pour les témoins, ce sérum est presque limpide chez les animaux traités. L'analyse électrophorétique de ces sérums concrétise cette observation en montrant une augmentation des lipides soudanophiles au niveau des γ-globulines chez les animaux témoins, alors que, chez les animaux traités, on ne décèle pas de variations importantes des lipoprotéines par rapport aux animaux à jeun.

Une variation de la répartition électrophorétique des lipides circulants traduit en fait une modification de la composition du sang en esters du cholestérol dont une partie importante, 44 % chez le rat, est constituée par des esters d'acides insaturés diénoïques et tétraénoïques (130). Les acides βγ-insaturés, en diminuant la teneur en acides gras insaturés et en cholestérol du foie, organe qui est la source principale du cholestérol sanguin (28, 61, 72) et en freinant les processus

d'estérification, adoucissent les perturbations importantes provoquées sur la répartition des lipoprotéines sanguines par la digestion.



Témoins Traités

protéinogramme (courbe supérieure)

lipidogramme (courbe inférieure hachurée).

d) Conclusion.

Toutes ces expériences confirment l'influence des acides βγ-insaturés à la fois sur le métabolisme du cholestérol et sur celui des acides gras. Nous avons vu auparavant combien ces deux métabolismes pouvaient être liés l'un à l'autre ; ces résultats ne font donc qu'apporter une preuve supplémentaire de ces interrelations métaboliques.

5°) CONCLUSIONS DU CHAPITRE.

Cette étude succincte des acides βγ-insaturés sur la lipogénèse permet de réaliser combien l'équilibre du métabolisme lipidique semble précaire chez l'animal.

L'intégration d'un acide βγ-insaturé dans la chaîne des réactions qui conduisent de la molécule d'acide acétique aux molécules plus complexes de cholestérol et d'acides gras crée une perturbation importante sans pour cela entraîner des phénomènes mortels.

En fait, ces acides βγ-insaturés, peu toxiques (dose léthale/50 : 7 g/Kg per os pour l'acide méthyl-3 pentène-3 oïque, *) provoquent chez l'animal une hypocholestérolémie assez importante résultant en général d'une double action :
- inhibition de la biosynthèse du cholestérol,
- inhibition de la biosynthèse et de la désaturation des acides gras.

Cette expérimentation met en évidence un autre fait : il existe, en dehors d'une régulation hormonale problématique, une régulation homéostasique du métabolisme des lipides. Une inhibition portant sur l'une des voies métaboliques de transformation de la molécule d'acide acétique en composés plus complexes provoque immédiatement des répercussions sur les autres processus intervenant dans l'utilisation de cette molécule, par suite du déséquilibre ainsi établi. Le fait que le cholestérol soit nécessaire pour le transport des graisses

---

(*) effectuée par Monsieur BEAUVILLAIN, Paris.

entraîne comme corollaire que les graisses et surtout les acides gras insaturés sont indispensables pour sa mobilisation normale.

En inhibant la synthèse du cholestérol, on voit rapidement apparaître des modifications dans la répartition des acides gras insaturés de l'organisme (diminution de l'indice d'iode des acides gras hépatiques, action sur les esters du cholestérol sanguin, action sur les lipoprotéines .

Il faut certainement tirer une conclusion beaucoup plus générale de tous ces faits : elle consiste en l'existence d'un équilibre physiologique naturel. Une modification d'un des facteurs entraîne automatiquement des répercussions sur les autres éléments de cet équilibre.

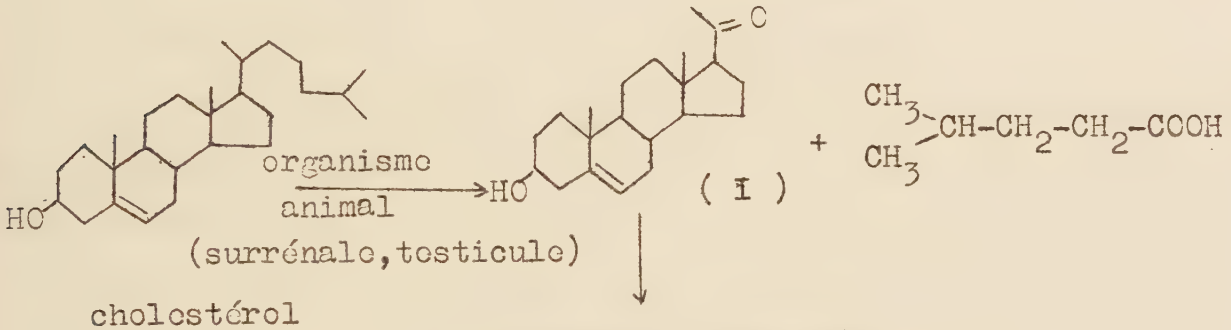
IV/ - TROISIEME PARTIE.

ACTION ANTIMASCULINISANTE

DES ACIDES βγ -INSATURES POLYSUBSTITUES.

1°) INTRODUCTION.

Devant la parenté de structure chimique existant entre le cholestérol et les hormones stéroïdes, BUTENANDT (27), en 1935, émettait l'hypothèse suivant laquelle le cholestérol serait le précurseur de toutes les hormones stéroïdes synthétisées par l'organisme animal. Ce n'est que très récemment, grâce à l'introduction des molécules radiochimiques en biologie, que cette étape fondamentale de la formation des hormones stéroïdes a pu être confirmée (14).



cholestérol

HORMONES STEROIDES .

Par la suite, plusieurs expériences in vitro et in vivo, utilisant du cholestérol marqué au ^{14}C, ont permis de déterminer les différentes réactions intervenant dans cette synthèse.

Le cholestérol uniformément marqué, incubé avec un homogénat de surrénales, est transformé par coupure de la chaîne latérale en prégnénolone (I) uniformément marquée (147, 158), qui devient alors le précurseur d'un certain nombre de corticostéroïdes radioactifs de la série de la désoxycorticostérone (141, 146).

Ces faits constituent bien les preuves expérimentales de l'hypothèse de BUTENANDT.

Si, par des substances chimiques, on arrive à diminuer la synthèse endogène du cholestérol et si l'organisme se trouve de ce fait limité quant à la quantité de cholestérol disponible, on peut agir sur la synthèse des hormones stéroïdes et obtenir une diminution de leur production. C'est pourquoi nous avons entrepris systématiquement, au cours de nos recherches sur les inhibiteurs de la biosynthèse du cholestérol, l'étude macroscopique des différents organes de nos animaux en expérience. Après avoir recueilli le sang par décapitation en vue du dosage du cholestérol sanguin, nous avons prélevé les glandes intervenant dans le métabolisme des hormones stéroïdes : surrénales, testicules, prostate, vésicules séminales, qui sont facilement accessibles et bien délimitées au point de vue anatomique. Ces différents organes ont été pesés, en opérant suffisamment vite pour éviter la dessiccation qui est très importante, surtout dans le cas des surrénales.

Les résultats obtenus avec les premiers inhibiteurs de la cholestérogénèse n'ont pas montré de différence appréciable entre les organes des animaux témoins et ceux des rats traités. Nous avons cependant remarqué que les inhibiteurs les plus actifs produisaient un effet très faible (non significatif), mais toujours dans le sens d'une diminution du poids des testicules. Ainsi, avec l'acide méthyl-3 pentène-3 oïque, nous avons obtenu un ralentissement du développement testiculaire de l'ordre de 10 % par rapport aux animaux témoins ou traités par un précurseur du cholestérol, comme l'acide diméthyl-acrylique. Cette différence rentre évidemment dans le domaine des erreurs expérimentales et pourrait provenir d'une diminution de la consommation alimentaire qui, nous le savons, a une très

grosse influence sur le développement des organes sexuels du jeune rat en voie de croissance (129). Mais, dans ces conditions, il faut une restriction alimentaire de l'ordre de 50 % pour obtenir un début d'effet, ce qui entraîne une perturbation importante de la croissance. Dans nos expériences, nous n'avons pas en général observé un tel trouble chez les animaux traités dont le poids est souvent légèrement supérieur à la moyenne des témoins.

Cependant, au fur et à mesure de nos expérimentations, nous avons cherché à modifier la chaîne latérale R- de l'acide de formule générale : $R - CH = \underset{\underset{CH_3}{|}}{C} - CH_2 - COOH$

Nous sommes arrivés à introduire une chaîne latérale R- possédant une ramification, par exemple : $R = - \underset{\underset{CH_3}{|}}{CH} - CH_3$ (isopropyle)

Dans ce cas, l'administration per os de ce composé : acide diméthyl-3,5 hexène-3 oïque (Cf. tableau 33 p. 138), sous forme de sel de sodium en solution dans l'eau, à la dose de 15 mg par jour et par animal, entraîne, chez des rats en voie de croissance, un ralentissement très marqué du développement du testicule, de l'ordre de 50 à 60 % par rapport au groupe témoin, sans provoquer d'autre part de perturbation importante de la croissance, sur un laps de temps de 30 jours.

Nous étions donc ici en présence d'un effet antimasculinisant de l'acide diméthyl-3,5 hexène-3 oïque qui, par ailleurs, se révélait légèrement inhibiteur de la cholestérogénèse (voir tableau 14 p. 78). Cependant, un rapport entre l'activité antimasculinisante et l'effet hypocholestérolémiant n'a pu être établi puisque l'acide éthyl-3 pentène-3 oïque, composé fortement

inhibiteur de la biosynthèse du cholestérol, n'a aucun effet sur le développement du testicule.

Il était donc intéressant de poursuivre nos observations dans cette voie, parallèlement à l'étude des inhibiteurs de la biosynthèse du cholestérol.

2°) ETUDE DE LA RELATION STRUCTURE-ACTIVITE.

1 - Variation en fonction de la structure.

Nous avons tout d'abord synthétisé un certain nombre de composés chimiques apparentés à l'acide diméthyl-3,5 hexène-3 oïque, afin de rechercher leur activité antimasculinisante et d'en déduire éventuellement la structure chimique responsable de cette propriété.

L'acide méthyl-3 pentène-3 oïque ne présentant pas d'effet antimasculinisant appréciable, l'apparition de cette propriété avec l'acide diméthyl-3,5 hexène-3 oïque pouvait provenir soit de la longueur de la chaîne carbonée, soit de l'existence de deux substituants dans cette molécule et de la position βγ de la double liaison. Nous avons donc effectué la synthèse d'un acide possédant une chaîne carbonée de même longueur que celle de l'acide diméthyl-3,5 hexène-3 oïque, mais ne possédant qu'un substituant en position 3, la double liaison éthylénique étant en position βγ par rapport à la fonction acide. Ce composé, l'acide méthyl-3 hexène-3 oïque, $CH_3 - CH_2 - CH = \underset{\displaystyle CH_3}{\overset{\displaystyle |}{C}} - CH_2 - COOH$ administré à de jeunes rats en voie de croissance (Cf. tableau 32, p. 137), à la même dose que l'acide précédent, n'a pas présenté d'action antimasculinisante. Il en a été de même avec l'acide méthyl-3 heptène-3 oïque,

$$CH_3 - CH_2 - CH_2 - CH = \underset{\displaystyle CH_3}{\overset{\displaystyle |}{C}} - CH_2 - COOH$$

étudié dans les mêmes conditions.

Il semblait donc nécessaire d'inclure un deuxième substituant sur la chaîne carbonée principale pour obtenir l'action antimasculinisante.

Afin de vérifier rapidement cette hypothèse, nous nous sommes adressés à une substance facilement accessible, l'acide iso-géranique ou acide diméthyl-3,7 octadiène-3,6 oïque :

$$CH_3 - \underset{\underset{CH_3}{|}}{C} = CH - CH_2 - CH = \underset{\underset{CH_3}{|}}{C} - CH - COOH$$

que l'on rencontre parfois dans la nature à l'état libre et qui peut être facilement préparé à partir du citral ou du géraniol par oxydation ménagée, puis transposition de la double liaison éthylénique de la position $\alpha\beta$ à la position $\beta\gamma$ par isomérisation alcaline. Ce composé qui possède, sur la chaîne carbonée principale, deux substituants, en position 3 et 7, s'est révélé un antimasculinisant à activité faible mais très nette (187) (Cf. Tableau 34, p. 139).

Nous devons signaler ici que l'acide isogéranique utilisé contenait certainement une quantité assez importante d'acide géranique pratiquement impossible à éliminer. Toutefois, dans ce cas particulier, nous avons remarqué une disparité importante des résultats. Le poids moyen des deux testicules des animaux témoins, en fin d'expérience, après une durée de 30 jours, se situe de 1,5 à 2 g. Chez les animaux traités qui par ailleurs ne présentent pas d'inhibition de la croissance corporelle, il y a de très grandes variations : on trouve, sur 15 rats traités:

- 6 rats dont le poids des testicules varie entre 1,5 et 2 g,
- 5 rats dont le poids des testicules varie entre 1 et 1,3 g,
- 4 rats, franchement anormaux, dont le poids des testicules

se trouve compris entre 500 mg et 1 g.

Si nous ne considérons que la moyenne du poids des testicules rapportée au poids du corps, nous obtenons une diminution de poids de l'ordre de 25 % :

Témoins : poids des testicules par rapport au poids du corps : 1,21 %

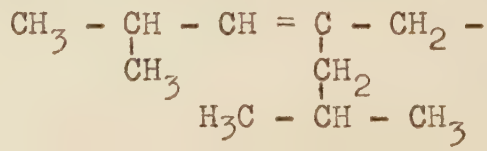
Traités : poids des testicules par rapport au poids du corps : 0,87 %;

mais cette valeur globale ne rend pas compte de la disparité très grande des valeurs dans le groupe des animaux traités seulement, phénomène qui se retrouve d'ailleurs avec les autres composés, mais avec une intensité plus faible.

Cette grande différence dans les réponses est certainement due aux antécédents des animaux utilisés dans ces expériences. Elle nous oblige à tenir compte de la notion de terrain qui a une grande importance en endocrinologie expérimentale. On connaît en effet la grosse influence de certaines carences sur le développement ou la réponse à une stimulation des glandes endocrines, ainsi que l'importance des facteurs externes, comme le manque de lumière par exemple, sur le fonctionnement de ces glandes (87).

Ce premier essai nous montrait qu'un deuxième substituant sur la chaîne carbonée principale était nécessaire à l'apparition du pouvoir antimasculinisant et que la longueur de la chaîne carbonée, dans une certaine limite, ainsi que la position des substituants n'avaient pas une influence importante sur l'activité des composés.

Nous avons alors effectué la synthèse d'un autre acide polysubstitué : l'acide isobutyl-3 méthyl-5 hexène-3 oïque,



où le substituant en position 3 est constitué par le groupement isobutyle, afin de déterminer l'influence de la nature des substituants (Cf. tableau 35, p. 140). Dans ce cas, nous nous sommes trouvés en présence d'une substance fortement antimasculinisante. Cet acide, administré à la dose de 10 mg par jour à des rats en voie de croissance, de poids moyen 60 à 70 g au début de l'expérience, produit une inhibition de 60 à 70 % du développement du testicule, après 30 jours d'administration (188) et n'a pratiquement pas d'effet sur la cholestérolémie (Témoins 82 mg % - Traités : 81 mg % - Cf. Tableau 16, p. 80).

D'autre part, il était nécessaire de connaître l'influence de la position de la double liaison éthylénique sur l'activité antimasculinisante des acides disubstitués.

L'expérimentation poursuivie avec les acides : diméthyl-3,5 hexène-2 oïque, $CH_3-\underset{CH_3}{CH}-CH_2-\underset{CH_3}{C}=CH-COOH$ (Cf. Tableau 36, p. 141),

et méthyl-5 isobutyl-3 hexène-2 oïque,

$$CH_3-\underset{CH_3}{\underset{|}{CH}}-CH_2-\underset{\underset{H_3C-CH-CH_3}{|}}{\underset{|}{C}}=CH-COOH$$ (Cf. Tableau 37, p. 142)

prouve que ces deux composés présente une activité relativement faible par rapport à leurs isomères βγ-insaturés, activité vraisemblablement due à la présence, dans ces composés, de 18 % d'isomère βγ-insaturé (voir p. 24). Le pourcentage d'inhibition est en effet d'environ 20 % pour le premier acide :

Témoins :	poids des testicules par rapport au poids du corps :	1,30 %
Traités :	poids des testicules par rapport au poids du corps :	1,04 %

et de 7 % pour le second :

Témoins : poids des testicules par rapport au poids du corps : 1,46 %

Traités : poids des testicules par rapport au poids du corps : 1,36 %

L'élimination de la double liaison dans la molécule semble faire entièrement disparaître le pouvoir antimasculinisant, ainsi que l'indiquent les résultats obtenus avec l'acide diméthyl-3,5 hexanoïque,

$$CH_3-\underset{CH_3}{CH}-CH_2-\underset{CH_3}{CH}-CH_2-COOH$$ (Cf. Tableau 38, p. 143)

Témoins : poids des testicules par rapport au poids du corps : 1,21 %

Traités : poids des testicules par rapport au poids du corps : 1,19 %.

Nous avons également recherché si l'acide β-hydroxylé correspondant à l'un des composés étudiés présentait une activité semblable. L'acide diméthyl-3,5 hydroxy-3 hexanoïque,

$$CH_3-\underset{CH_3}{CH}-CH_2-\underset{CH_3}{\overset{OH}{C}}-CH_2-COOH$$

ne provoque pas d'inhibition importante du développement du testicule chez le rat en voie de croissance.

Témoins : poids des testicules par rapport au poids du corps : 1,28 %

Traités : poids des testicules par rapport au poids du corps : 1,20 %.

Ceci paraît d'ailleurs normal puisque l'on sait que le métabolisme des acides β-hydroxylés conduit :

- soit par déshydratation (176) à l'acide αβ-insaturé correspondant : acide diméthyl-3,5 hexène-2 oïque qui, nous l'avons vu, est inactif,

- soit par déshydrogénation (42) à l'acide β-cétonique où le substituant méthyl-3 n'existe plus : $CH_3-\underset{\underset{CH_3}{|}}{CH}-CH_2-CO-CH_2-COOH$

La présence de la fonction acide libre dans la molécule ne semble pas nécessaire puisque l'ester éthylique de l'acide diméthyl-3,5 hexène-3 oïque se comporte aussi comme un anti-masculinisant (Cf. tableau 39, p. 144).

Témoins : poids des testicules par rapport au poids du corps : 1,31 %

Traités : poids des testicules par rapport au poids du corps : 0,93 %.

Cependant, l'estérification de la fonction acide paraît fortement augmenter la toxicité du composé qui agit aussi sur la croissance, provoquant une inhibition de l'ordre de 35 à 40 %.

Ces différents résultats permettent de conclure que l'activité antimasculinisante des acides substitués insaturés est due à la présence, dans la molécule, d'une double liaison éthylénique en position β par rapport à la fonction acide et de deux ou plusieurs substituants sur la chaîne carbonée principale.

Tableau 31 - Activité antimasculinisante des différents acides étudiés.

Composés essayés	Cf. Tabl. n°	poids des testicules / poids du corps		Inhibition en %
		Témoins	Traités	
$CH_3-CH_2-CH=C(CH_3)-CH_2-COOH$	32 p.137	1,23	1,30	# 0
$CH_3-CH_2-CH_2-CH=C(CH_3)-CH_2-COOH$		1,31	1,22	# 0
$CH_3-CH(CH_3)-CH=C(CH_3)-CH_2-COOH$	33 p.138	1,30	0,70	- 46
$CH_3-C(CH_3)=CH-CH_2-CH=C(CH_3)-CH_2-COOH$	34 p.139	1,21	0,87	- 28
$CH_3-CH(CH_3)-CH=C(CH_2-CH(CH_3)-CH_3)-CH_2-COOH$	35 p.140	1,65	0,58	- 65
$CH_3-CH(CH_3)-CH_2-C(CH_3)=CH-COOH$	36 p.141	1,30	1,04	- 20
$CH_3-CH(CH_3)-CH_2-C(CH_2-CH(CH_3)-CH_3)=CH-COOH$	37 p.142	1,46	1,36	# 0
$CH_3-CH(CH_3)-CH_2-CH(CH_3)-CH_2-COOH$	38 p.143	1,21	1,19	# 0
$CH_3-CH(CH_3)-CH_2-C(OH)(CH_3)-CH_2-COOH$		1,28	1,20	# 0
$CH_3-CH(CH_3)-CH=C(CH_3)-CH_2-COOC_2H_5$	39 p.144	1,31	0,93	- 30

2 - Tableaux détaillés des essais.

Nous donnons ci-après les résultats détaillés obtenus avec chaque composé.

Tableau 32 - Acide méthyl-3 hexène-3 oïque.

$$CH_3 - CH_2 - CH = \underset{\displaystyle CH_3}{\overset{\displaystyle |}{C}} - CH_2 - COOH$$

posologie : 15 mg/j par rat sous forme de sel de sodium.

Croissance : Témoins - poids au départ : 60 g
poids après 30 jrs : 130 g Δ = + 117 %

Traités - poids au départ : 59 g
poids après 30 jrs : 128 g Δ = + 117 %

Témoins			Traités		
poids du corps (en g) (*) A	poids des testicules (en g) B	B / A en %	poids du corps (en g) (*) A	poids des testicules (en g) B	B / A en %
131	1,407	1,08	143	1,880	1,31
122	1,320	1,06	115	1,720	1,50
150	1,860	1,24	140	2,200	1,57
127	1,360	1,07	117	1,610	1,37
143	1,512	1,06	127	1,400	1,10
130	1,450	1,12	120	1,390	1,16
131	2,067	1,58	140	1,795	1,28
131	1,825	1,39	141	2,000	1,41
153	2,257	1,47	136	1,850	1,36
132	1,830	1,39	132	1,795	1,36
123	1,563	1,27	127	1,442	1,12
146	1,627	1,12	127	1,316	1,05
119	1,292	1,08	148	1,945	1,31
136	1,578	1,16	132	1,543	1,17
			118	1,688	1,43
moyenne :					
133 g	1,639 g	1,23 %	131 g	1,704 g	1,30 %

(*) poids vif après un jeûne de 10 h. Idem pour toutes les expériences.

Tableau 33 - Acide diméthyl-3,5 hexène-3 oïque

$$CH_3 - \underset{\underset{CH_3}{|}}{CH} - CH = \underset{\underset{CH_3}{|}}{C} - CH_2 - COOH$$

posologie : 15 mg/j par rat sous forme de sel de sodium.

croissance : Témoins - poids moyen au départ : 57 g
poids moyen après 30j : 132 g Δ = + 131%

Traités - poids moyen au départ : 56 g
poids moyen après 30 j: 126 g Δ = + 123%

Témoins			Traités		
poids du corps (en g) A	poids des testicules (en g) B	B / A en %	poids du corps (en g) A	poids des Testicules (en g) B	B / A en %
129	1,860	1,44	93	0,550	0,59
142	1,668	1,18	110	0,580	0,52
158	1,980	1,24	113	0,340	0,30
147	2,002	1,37	111	0,610	0,55
144	1,720	1,19	131	1,512	1,15
115	1,650	1,44	90	0,814	0,90
138	1,785	1,29	130	0,752	0,58
117	1,305	1,12	121	1,280	1,05
148	1,732	1,17	124	0,746	0,60
133	2,100	1,58	123	1,008	0,82
122	1,806	1,48	95	0,580	0,61
129	1,463	1,14	82	0,580	0,71
137	1,715	1,26	145	0,995	0,69
132	1,815	1,38	125	1,000	0,80
moyenne :					
135 g	1,757 g	1,30 %	113 g	0,810 g	0,71 %

Tableau 34 - Acide diméthyl-3,7 octadiène-3,6 oïque

$$CH_3 - \underset{\underset{CH_3}{|}}{C} = CH - CH_2 - CH = \underset{\underset{CH_3}{|}}{C} - CH_2 - COOH$$

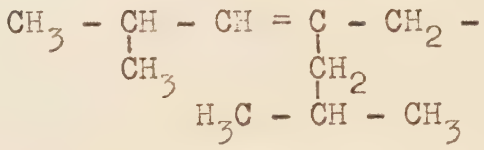
posologie : 18 mg/j par rat sous forme de sel de sodium.

croissance : Témoins - poids moyen au départ : 65 g
poids moyen après 30j : 131 g Δ = + 101%

Traités - poids moyen au départ : 61 g
poids moyen après 30j : 131 g Δ = + 115%

Témoins			Traités		
poids du corps (en g) A	poids des testicules ($en_B g$)	B / A en %	poids du corps (en g) A	poids des testicules ($en_B g$)	B / A en %
122	1,586	1,30	121	0,710	0,59
128	1,604	1,25	120	0,850	0,71
145	1,660	1,14	127	0,556	0,44
163	1,740	1,08	141	1,080	0,77
153	1,872	1,23	136	1,120	0,82
144	2,052	1,43	148	1,240	0,84
143	1,500	1,05	168	1,540	0,92
153	1,700	1,12	143	1,260	0,88
147	1,680	1,15	148	1,552	1,05
167	2,360	1,41	125	1,216	0,97
135	1,380	1,03	120	1,420	1,18
153	1,784	1,17	185	2,090	1,13
151	1,760	1,17	169	1,840	1,09
183	2,620	1,43	140	1,300	0,93
			137	1,700	1,24
moyenne :					
149 g	1,814 g	1,21 %	149 g	1,298 g	0,87 %

Tableau 35 - Acide isobutyl-3 méthyl-5 hexène-3 oïque.



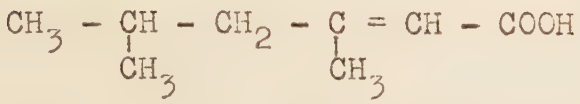
posologie : 10 mg/j par rat sous forme de sel de sodium

Croissance : Témoins - poids moyen initial : 62 g
poids moyen après 35j : 130 g Δ = +110%

Traités - poids moyen initial : 67 g
poids moyen après 35j : 133 g Δ = +100%

Témoins			Traités		
poids du corps (en g) A	poids des testicules (en g) B	B / A en %	poids du corps (en g) A	poids des testicules (en g) B	B / A en %
123	1,120	0,90	121	0,379	0,31
120	1,855	1,55	99	0,221	0,22
129	2,286	1,77	105	0,195	0,19
138	2,448	1,77	120	0,430	0,36
113	2,073	1,84	118	0,338	0,29
134	2,365	1,79	136	0,899	0,66
94	1,980	2,11	148	1,950	1,32
125	2,377	1,89	136	1,100	0,83
113	2,180	1,93	154	2,402	1,56
111	2,033	1,84	115	0,250	0,22
134	2,133	1,61	136	0,963	0,71
128	1,850	1,45	122	0,310	0,25
87	1,255	1,44	130	0,356	0,27
121	1,821	1,51	110	0,410	0,37
120	2,255	1,88	124	0,714	0,58
moyenne :					
119 g	1,960 g	1,65 %	125 g	0,729 g	0,58%

Tableau 36 - Acide diméthyl-3,5 hexène-2 oïque.



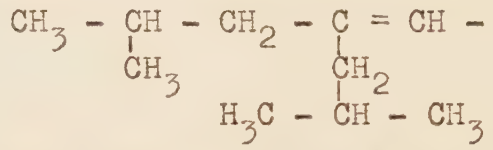
posologie : 15 mg/j par rat sous forme de sel de sodium.

croissance: Témoins - poids moyen initial : 56 g
poids moyen après 37j : 141 g Δ = +152%

Traités - poids moyen initial : 56 g
poids moyen après 37j : 123 g Δ = +120%

Témoins			Traités		
poids du corps (en g) A	poids des testicules (en g) B	B / A en %	poids du corps (en g) A	poids des testicules (en g) B	B / A en %
125	1,570	1,26	130	1,480	1,04
144	2,235	1,56	120	1,615	1,35
152	2,050	1,35	98	0,170	0,18
147	1,775	1,21	105	1,035	0,98
156	2,150	1,38	144	1,176	0,82
177	2,270	1,29	153	1,380	0,90
159	2,077	1,33	115	1,121	0,97
147	1,680	1,15	144	1,945	1,35
167	2,360	1,41	126	1,902	1,51
153	1,784	1,17	167	1,401	0,84
132	1,815	1,38	160	1,826	1,04
152	1,980	1,31	141	2,091	1,49
129	1,463	1,14	125	1,378	1,10
moyenne :					
149 g	1,939 g	1,30 %	134 g	1,395 g	1,04%

Tableau 37 - Acide isobutyl-3 méthyl-5 hexène-2 oïque.



posologie : 10 mg/j par rat sous forme de sel de sodium.

croissance: Témoins - poids moyen initial : 61 g
poids moyen après 37j : 140 g Δ = +130 %

Traités - poids moyen initial : 59 g
poids moyen après 37j : 137 g Δ = +131 %

Témoins			Traités		
poids du corps (en g) A	poids des testicules (en g) B	B / A en %	poids du corps (en g) A	poids des testicules (en g) B	B / A en %
135	2,150	1,59	134	1,645	1,23
129	1,985	1,54	158	2,000	1,27
138	2,272	1,65	144	2,142	1,49
155	2,436	1,57	151	2,196	1,45
107	1,545	1,44	149	2,007	1,35
149	2,140	1,44	145	1,989	1,37
133	1,850	1,39	113	1,575	1,39
133	1,785	1,34	136	2,203	1,62
174	2,255	1,31	134	2,125	1,59
118	1,735	1,47	112	1,610	1,44
145	2,110	1,45	130	2,051	1,58
			180	2,442	1,35
moyenne :					
138 g	2,024 g	1,46 %	140 g	1,998 g	1,36 %

Tableau 38 - Acide diméthyl-3,5 hexanoïque.

$$CH_3 - \underset{\underset{CH_3}{|}}{CH} - CH_2 - \underset{\underset{CH_3}{|}}{CH} - CH_2 - COOH$$

posologie : 15 mg/j par rat sous forme de sel de sodium.

croissance: Témoins - poids moyen initial : 56 g
poids moyen après 37j : 141 g Δ = +152%

Traités - poids moyen initial : 61 g
poids moyen après 37j : 159 g Δ = +161%

Témoins			Traités		
poids du corps (en g) A	poids des testicules (en g) B	B / A en %	poids du corps (en g) A	poids des testicules (en g) B	B / A en %
120	1,570	1,31	129	1,870	1,47
144	2,235	1,55	122	1,275	1,05
152	2,005	1,32	166	2,045	1,23
127	1,425	1,13	138	1,930	1,51
160	1,880	1,17	157	1,650	1,05
154	1,650	1,07	148	1,150	0,78
145	1,410	0,98	148	2,173	1,47
133	1,495	1,12	163	1,820	1,12
160	1,820	1,14	121	1,740	1,44
147	1,775	1,20	132	1,727	1,31
156	1,820	1,17	153	1,835	1,20
177	2,075	1,18	189	2,250	1,19
159	2,277	1,14	178	1,790	1,01
			173	2,344	1,35
			154	1,610	1,05
moyenne :					
149 g	1,803 g	1,21 %	151 g	1,810 g	1,19%

Tableau 39 - Diméthyl-3,5 hexène-3 oate d'éthyle

$$CH_3 - \underset{\underset{CH_3}{|}}{CH} - CH = \underset{\underset{CH_3}{|}}{C} - CH_2 - COOC_2H_5$$

posologie : 15 mg/j par rat en solution dans l'alcool à 50°.

croissance: Témoins - poids moyen initial : 66 g
poids moyen après 35j : 141 g Δ = + 133%

Traités - poids moyen initial : 62 g
poids moyen après 35j : 119 g Δ = + 92%

Témoins			Traités		
poids du corps (en g) A	poids des testicules (en g) B	B / A en %	poids du corps (en g) A	poids des testicules (en g) B	B / A en %
125	1,870	1,49	96	0,455	0,48
134	2,235	1,67	94	0,630	0,67
142	2,005	1,42	98	0,612	0,63
127	1,625	1,28	107	1,011	0,94
114	1,484	1,30	86	0,318	0,37
150	1,880	1,25	106	1,011	0,95
144	1,650	1,15	122	1,181	0,98
135	1,710	1,27	105	1,071	1,02
123	1,595	1,29	105	1,290	1,12
150	1,820	1,21	119	1,140	0,96
137	1,775	1,29	138	1,543	1,12
143	1,820	1,25	119	1,063	0,89
167	2,075	1,25	148	1,875	1,26
159	2,277	1,46	122	1,073	0,88
moyenne : 139 g	1,844 g	1,31 %	112 g	1,020 g	0,92%

3°) ETUDE DE L'ACTION DES ACIDES DISUBSTITUES βγ-INSATURES.

Après avoir entrepris une série d'expériences qui nous ont permis de préciser la structure chimique responsable de l'activité antimasculinisante, nous avons essayé d'étudier, plus en détail, l'action de ces composés sur les animaux traités. Il était en outre nécessaire d'observer l'effet de cette castration chimique sur les autres glandes accessoires ainsi que sur les surrénales.

La technique d'essai utilisée consiste toujours à donner per os, chaque jour, la quantité de substance à étudier sous forme de sel de sodium, à des rats recevant comme nourriture le régime alimentaire contenant 10 % de saindoux précédemment décrit. En fin d'expérimentation, les animaux sont sacrifiés par décapitation et les principales glandes : testicules, vésicules séminales, prostate et surrénales, sont disséquées humides et pesées immédiatement ; quelques-unes sont fixées dans le formol à 10 % ou dans le liquide de BOUIN, afin de permettre leur étude histologique.

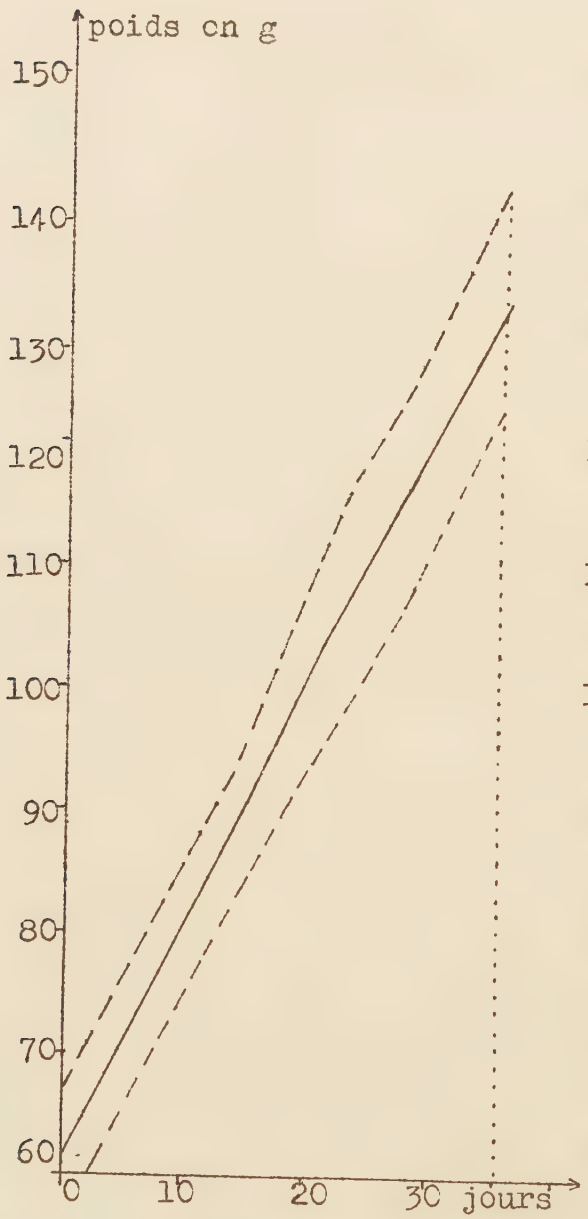
Nous allons envisager successivement l'action de l'acide isobutyl-3 méthyl-5 hexène-3 oïque chez le rat mâle et celle de l'acide diméthyl-3,5 hexène-3 oïque chez le rat femelle.

1 - Effets chez le rat mâle en voie de croissance.

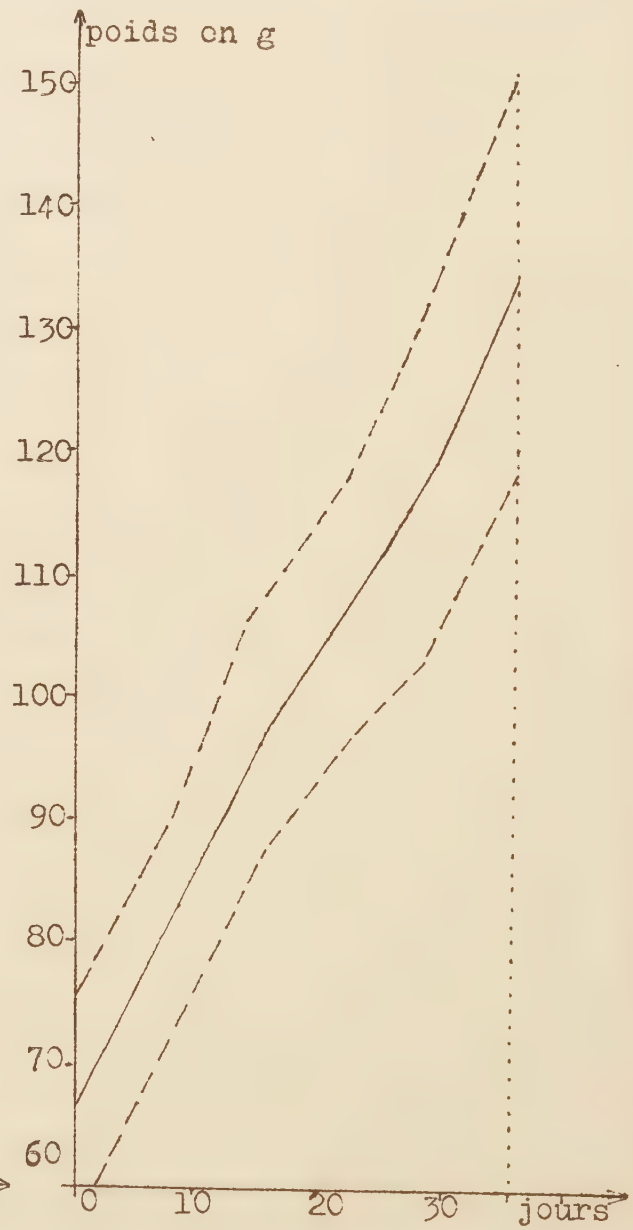
L'acide isobutyl-3 méthyl-5 hexène-3 oïque a été administré à la dose de 10 mg par jour pendant 35 jours. Chaque animal a été régulièrement pesé toutes les semaines.

a) Effets sur la croissance.

Pratiquement, nous n'avons pas observé de modification de la croissance pendant les 35 jours de l'expérimentation. La différence de poids entre les animaux témoins et traités ne dépasse pas 10 % (Cf. courbes ci-dessous), limite d'erreur admise.



Animaux témoins



Animaux traités

b) Effets sur les organes accessoires et les surrénales.

La pesée des organes prélevés après sacrifice des animaux a été consignée dans les tableaux 40 et 41.

Tableau 40 - Animaux témoins.

poids du corps en g	Testicules		Prostate		Vésicules séminales		Surrénales	
	poids en g	%	poids en g	%	poids en g	%	poids en mg	mg % g
123	1,120	0,91	0,156	0,13	0,398	0,32	27	22
120	1,855	1,55	0,147	0,12	0,453	0,38	32	27
129	2,286	1,77	0,165	0,13	0,387	0,30	30	23
138	2,448	1,77	0,178	0,13	0,463	0,34	32	23
113	2,073	1,84	0,161	0,14	0,417	0,37	30	27
134	2,365	1,79	0,130	0,10	0,373	0,28	42	31
94	1,980	2,11	0,145	0,15	0,367	0,39	26	28
125	2,377	1,89	0,153	0,12	0,459	0,37	32	26
113	2,180	1,93	0,168	0,15	0,398	0,35	28	25
111	2,033	1,84	0,162	0,15	0,373	0,34	31	28
134	2,133	1,61	0,212	0,16	0,507	0,38	25	19
128	1,850	1,45	0,146	0,11	0,453	0,35	20	16
87	1,255	1,44	0,127	0,15	0,287	0,33	39	45
121	1,820	1,51	0,153	0,13	0,469	0,39	22	18
120	2,255	1,88	0,137	0,11	0,483	0,40	37	31
moyenne :								
119g	1,960g	1,65%	0,156g	0,13%	0,419g	0,35%	30mg	25mg%g

Valeurs moyennes pour 100 g de corps (déterminées au moyen du calcul statistique donné dans la deuxième partie).

Testicules : $1{,}65 \pm 0{,}09$ g

Prostate : 130 ± 5 mg

Vésicules séminales : 350 ± 10 mg

Surrénales : 25 ± 2 mg

Tableau 41 - Animaux traités.

posologie : 10 mg/j par rat d'acide isobutyl-3 méthyl-5 hexène-3 oïque.

poids du corps en g	Testicules		Prostate		Vésicules séminales		Surrénales	
	poids en g	%	poids en g	%	poids en g	%	poids en mg	mg % g
121	0,379	0,31	0,018	0,01	0,072	0,06	48	40
99	0,221	0,22	0,007	0,01	0,035	0,04	43	43
105	0,195	0,19	0,008	0,01	0,017	0,02	45	43
120	0,430	0,36	0,021	0,02	0,107	0,09	45	38
118	0,338	0,29	0,017	0,01	0,087	0,07	38	37
135	0,899	0,66	0,023	0,02	0,053	0,04	41	30
148	1,950	1,32	0,110	0,07	0,452	0,31	41	28
136	1,110	0,83	0,037	0,03	0,127	0,10	47	35
154	2,402	1,56	0,185	0,10	0,285	0,19	54	35
115	0,250	0,22	0,011	0,01	0,043	0,04	41	36
136	0,963	0,71	0,035	0,02	0,066	0,05	43	37
122	0,310	0,25	0,018	0,01	0,037	0,03	42	35
130	0,356	0,27	0,042	0,03	0,053	0,04	43	33
110	0,410	0,37	0,036	0,03	0,064	0,06	38	35
124	0,714	0,58	0,057	0,04	0,158	0,13	43	35
moyenne : 125g	0,729g	0,58%	0,042g	0,03%	0,110g	0,09%	44mg	35mg%g

Valeurs moyennes pour 100 g de corps :

Testicules : 0,58 ± 0,11 g

Prostate : 30 ± 7 mg

Vésicules séminales : 90 ± 20 mg

Surrénales : 35 ± 1 mg.

Nous pouvons représenter ces résultatsexprimés pour 100 g de corps sous la forme suivante :

	Testicules (en g)	Prostate (en mg)	Vésicules séminales (en mg)	Surrénales (en mg)
Témoins :	1,56 g	125 mg	340 mg	27 mg
Traités :	0,69 g	37 mg	110 mg	34 mg
Variation en % (limite inférieure)	- 56 %	- 70 %	- 68 %	+ 26 %

c) Etude histologique des différentes glandes atrophiées (*)

Testicules : léger oedème du tissu interstitiel. Trouble de la lignée séminale avec blocage précoce des mitoses. Absence de spermatozoïdes. (Cf. Coupes en haut de la page intercalaire ci-après).

Organes accessoires -

Vésicules séminales : épithélium fortement aplati, avec disparition presque complète des grains sécrétoires des cellules épithéliales.

Prostate : Atrophie de l'épithélium des lobes dorsaux latéraux, avec disparition de la zone claire située entre le noyau dorsal et l'apex libre. Atrophie de l'épithélium des glandes de COOPER. Stratification des cellules du canal déférent.

Pratiquement, on retrouve dans ces perturbations histologiques des organes accessoires des effets comparables à ceux de la castration chirurgicale (23).

(*) Nous remercions ici Monsieur le Professeur J. COUDERT de la Faculté de Médecine de Lyon qui a bien voulu examiner ces coupes et nous communiquer ses observations.

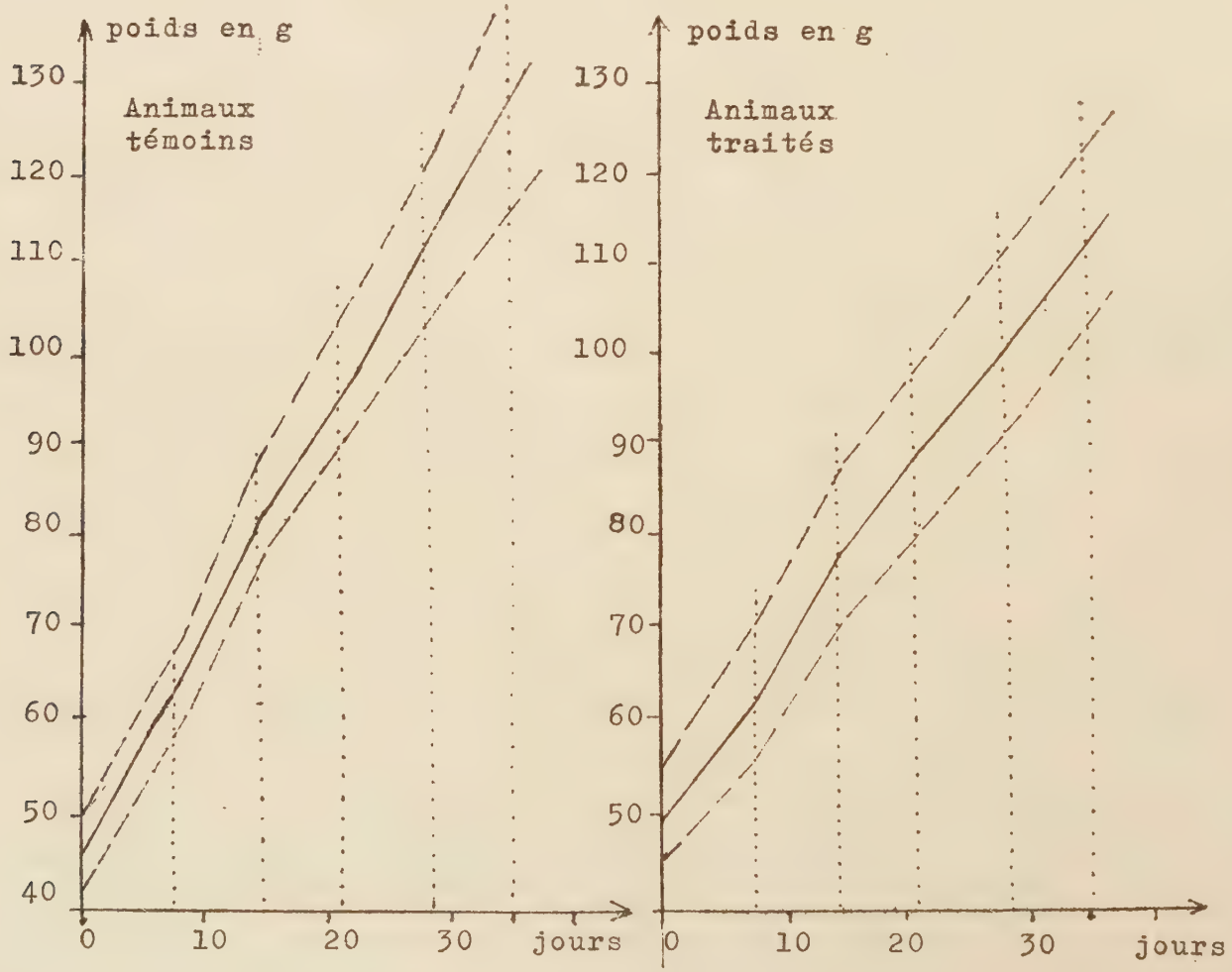
2 - Effets chez le rat femelle en voie de croissance.

L'essai a été conduit sur deux lots de rats femelles impubères, de poids moyen 47 g au début de l'expérimentation, recevant ad libitum le régime à 10 % de saindoux précédemment décrit.

L'acide diméthyl-3,5 hexène-3 oïque a été administré aux animaux traités, per os, sous forme de sel de sodium, à la dose de 15 mg par jour et par rat.

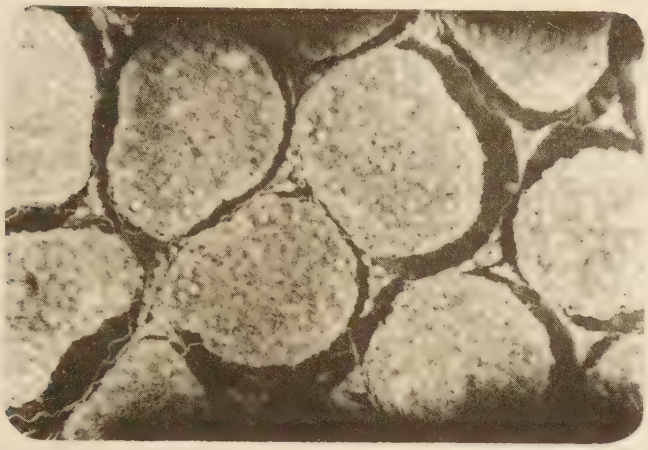
a) Effets sur la croissance.

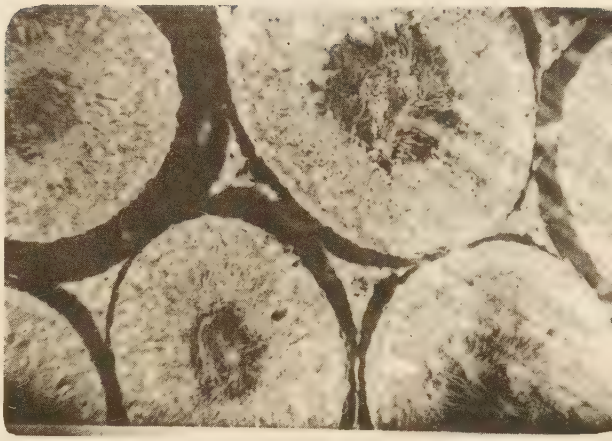
L'acide diméthyl-3,5 hexène-3 oïque a un pouvoir inhibiteur beaucoup plus prononcé sur la croissance du rat femelle que sur celle du rat mâle. Dans cette expérience, la valeur de l'inhibition est d'environ - 25 %, après 37 jours d'administration, alors qu'elle ne dépasse pas 10 % avec les rats mâles.



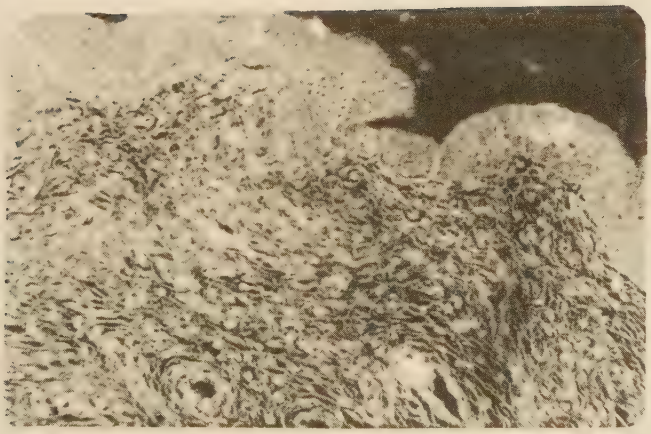
TRAITES

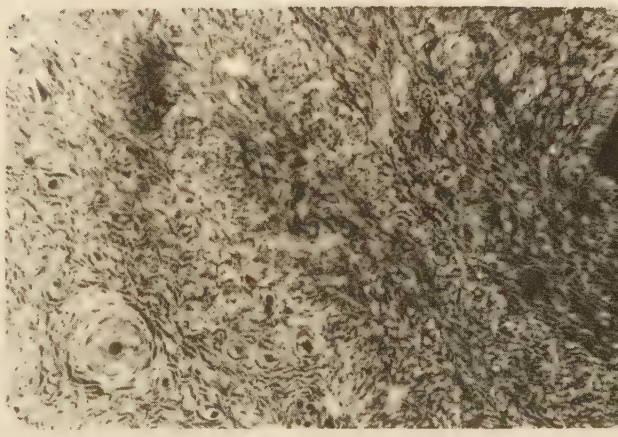
TEMOINS





Testicules





Utérus

b) Effets sur les organes génitaux et les surrénales.

Les pesées des différents organes prélevés ont été consignées dans le tableau 42.

Tableau 42.

Rats femelles témoins.						
poids du corps (en g)	Utérus		Ovaires		Surrénales	
	poids (en mg)	mg % g	poids (en mg)	mg % g	poids (en mg)	mg % g
143	90	70	84	58	47	33
125	142	110	56	45	42	34
96	37	40	19	39	44	46
153	125	80	73	47	40	26
135	161	120	46	34	49	36
143	205	140	63	44	51	36
126	117	100	43	34	43	34
156	280	180	90	58	65	42
127	97	80	24	19	39	31
143	127	90	67	47	47	33
moy. 135 g	138mg	100mg%g	57 mg	42mg%g	46 mg	34mg%g
Rats femelles traités						
130	266	204	48	37	38	29
108	127	118	39	36	37	34
111	212	191	38	34	32	29
136	578	426	58	43	41	30
114	158	139	49	43	39	34
103	505	490	54	52	30	30
115	208	181	48	42	33	29
129	220	171	28	22	32	25
94	66	70	24	26	25	27
117	118	100	41	35	28	24
moy. 116 g	246 mg	210mg%g	43 mg	37mg%g	34 mg	29mg%g

Valeurs moyennes pour 100 g de corps (déterminées au moyen de la méthode statistique décrite dans la deuxième partie) :

	Utérus	Ovaires	Surrénales
Témoins :	100 ± 13 mg	42 ± 3 mg	34 ± 2 mg
Traités :	210 ± 44 mg	37 ± 3 mg	29 ± 1 mg
Variation en % (limite inférieure)	+ 47 %	0 %	- 6 %

c) Etude histologique des différents organes.

Ovaire : Il y a pratiquement très peu de modifications de l'histologie des ovaires des animaux traités par rapport aux témoins. On n'aperçoit ni grand follicule, ni corps jaunes.

Utérus : Le stroma est légèrement oedémateux (Cf. coupes au bas de la page intercalaire ci-avant).

Vagin : L'épithélium a une hauteur un peu plus importante chez les animaux traités que chez les témoins.

3 - Essai de gestation.

Nous ne ferons que signaler un essai de gestation, mais le nombre insuffisant d'animaux utilisés ne nous permet pas d'en tirer une conclusion statistiquement valable.

3 rats mâles témoins et 5 rats mâles traités d'une part, ainsi que 2 rats femelles témoins et 4 rats femelles traités d'autre part, ont été conservés en fin d'expérience et maintenus dans les mêmes conditions durant environ un mois. Les animaux traités continuent à recevoir chaque jour le composé étudié : l'acide diméthyl-3,5 hexène-3 oïque.

Lorsque les animaux sont âgés de 110 à 120 jours, on met dans des cages séparées 1 mâle avec 2 femelles, de la façon suivante :

1 mâle traité + 2 femelles traitées,

1 mâle traité + 2 femelles témoins,

1 mâle témoin + 2 femelles traitées,

le mâle étant changé tous les huit jours.

Aucune fécondation n'a été obtenue dans les deux premiers groupes, sur un laps de temps de 40 jours durant lequel l'administration des composés étudiés était poursuivie.

Un début de gestation a été constaté à l'autopsie, chez une des femelles du troisième groupe.

4) Importance de l'âge des animaux sur l'action anti-masculinisante.

A la suite des résultats obtenus chez le jeune rat en voie de croissance, nous avons voulu connaître l'effet des acides $\beta\gamma$-insaturés disubstitués sur le tractus génital mâle des rats adultes.

Le protocole expérimental utilisé est semblable à celui suivi au cours des précédentes expérimentations. Les animaux adultes sont divisés en deux lots homogènes, le premier lot servant de témoin, le deuxième lot recevant 15 mg par jour d'acide isobutyl-3 méthyl-5 hexène-3 oïque. Ils sont sacrifiés après 40 jours de traitement. Les résultats ont été consignés dans le tableau 43 ci-après.

Tableau 43 - Essai de l'acide isobutyl-3 méthyl-5 hexène-3 oïque chez des rats adultes (*)

Témoins			Traités		
poids du corps (en g) A	poids des testicules (en g) B	B / A en %	poids du corps (en g) A	poids des testicules (en g) B	B / A en %
236	2,608	1,10	230	2,045	0,87
217	2,490	1,15	238	2,340	0,98
210	2,480	1,18	245	2,417	0,98
218	2,627	1,21	252	2,720	1,08
223	2,496	1,12	225	2,330	1,04
217	2,479	1,14	208	2,210	1,06
214	2,342	1,10	207	2,170	1,05
231	2,496	1,08	246	2,535	1,03
225	2,455	1,09	213	2,562	1,21
236	2,701	1,15	203	2,400	1,19
moyenne : 223 g	2,517 g	1,13 %	227 g	2,373 g	1,04 %

(*) L'aliment utilisé est le régime à 10 % de saindoux précédemment décrit.

Pratiquement, on n'observe qu'une très faible inhibition du poids des testicules d'environ 12 %, chez les animaux traités par rapport aux témoins.

Ce résultat nous a incités à rechercher l'activité comparative de l'acide diméthyl-3,5 hexène-3 oïque sur des rats d'âge différent. Nous avons utilisé deux groupes de rats, l'un de poids moyen 56 g au début de l'expérience (5 semaines environ), l'autre de poids moyen 75 g (7 semaines environ). Chacun des lots reçoit, pendant 30 jours, 15 mg par jour et par rat d'acide diméthyl-3,5 hexène-3 oïque, sous forme de sel de sodium. Le poids moyen des testicules des rats du premier groupe se situe autour de 0,760 $\pm$ 0,070 g (Cf. tableau 44, ci-après), alors que, chez les animaux du deuxième groupe, les testicules pèsent en moyenne 1,120 $\pm$ 0,090 g (Cf. tableau 44).

Tableau 44 - Influence de l'âge sur l'activité antimasculinisante de l'acide diméthyl-3,5 hexène-3 oïque.

posologie : 15 mg/jour par rat sous forme de sel de sodium (régime à 10 % de sain-doux)

Traités I (âge : 5 semaines)		Traités II (âge : 7 semaines)	
poids du corps (en g)	poids des testicules (en g)	poids du corps (en g)	poids des testicules (en g)
120	0,830	135	1,233
111	0,400	127	0,850
122	0,950	128	1,116
107	0,533	148	1,015
98	0,534	142	1,545
131	1,000	135	1,145
112	0,750	125	1,052
121	1,020	138	1,152
105	0,930	120	1,000
113	0,740	122	1,062
moyenne :			
114 g	0,758 g	132 g	1,117 g

En comparant les rapports du poids des testicules après les 30 jours d'expérience sur le poids des animaux au départ, dans les deux groupes, on constate une similitude des deux valeurs obtenues :

- Rats de 56 g au début de l'expérimentation :

$$\frac{\text{poids des testicules après 30 jrs}}{\text{poids du corps au départ}} = \frac{0,760\ g}{56\ g} = 1,36 \pm 0,07\ \%$$

- Rats de 75 g au début de l'expérimentation :

$$\frac{\text{poids des testicules après 30 jrs}}{\text{poids du corps au départ}} = \frac{1,120\ g}{75\ g} = 1,46 \pm 0,10\ \%$$

Ceci permet de penser que les acides βγ-insaturés disubstitués bloquent le développement des testicules chez le jeune rat en voie de croissance sans atrophier l'organe déjà formé. Cette hypothèse n'est certainement valable que durant le laps de temps très court de nos observations. Elle permet par contre de comprendre l'inefficacité de ces composés chez les rats adultes.

Ces acides seraient donc des substances bloquant le développement des cellules en voie d'évolution rapide, ce qui expliquerait l'effet antimitotique net constaté sur les coupes histologiques des testicules.

5 - Etude biologique de l'effet antimasculinisant.

a) Influence d'injection de testostérone sur l'effet antimasculinisant.

En vue de préciser les différentes manifestations de l'action antimasculinisante des acides disubstitués βγ-insaturés, nous avons recherché si les tissus atrophiés : prostate et vésicules séminales, conservaient leurs possibilités de réponse à une stimulation hormonale. En effet, dans le cas d'une castration chirurgicale, l'atrophie des organes génitaux accessoires du rat peut être évitée par une injection quotidienne de testostérone (102, 131), le développement pondéral de la prostate et des vésicules séminales étant alors proportionnel, dans une stricte limite de dosage, à la quantité d'hormone injectée (127).

Nous avons suivi le protocole expérimental suivant : Trois lots de 10 jeunes rats en voie de croissance, de poids moyen 56 g au début de l'expérimentation, ont été soumis au régime à 10 % de saindoux précédemment décrit. Le premier lot ne reçoit aucun supplément ; les deuxième et troisième lots reçoivent per os 15 mg par jour et par rat d'acide isobutyl-3 méthyl-5 hexène-3 oïque, sous forme de sel de sodium.

A la fin de la première semaine de traitement, le troisième lot reçoit en outre une injection sous-cutanée unique de 0,8 cm3 de "Stérandryl retard 50 mg" ROUSSEL (*) (57), soit 20 mg d'hexahydrobenzoate de testostérone.

Les animaux des trois groupes sont sacrifiés par décapitation 22 jours après l'injection de testostérone. L'autopsie de chaque animal est pratiquée immédiatement après la mort. Les organes sont disséqués humides et pesés avant dessiccation. Les résultats obtenus sont consignés dans les tableaux suivants 45, 46, 47.

(*) Nous remercions les Etablissements ROUSSEL qui ont bien voulu nous fournir gracieusement ce produit.

Tableau 45 - lot témoin.

10 rats maintenus au régime à 10 % de saindoux.

Croissance : poids moyen initial : 56 g
poids moyen après 7 jrs : 69 g
poids moyen après 29 jrs : 133 g Δ = + 93 %

poids du corps (en g)	poids des testicules (en g)	poids des vésicules séminales (en mg)	poids de la prostate (en mg)
126	1,920	480	180
132	2,030	390	210
141	1,840	530	193
118	1,782	410	152
158	2,253	610	232
136	2,005	490	187
144	1,952	570	152
143	1,893	520	197
122	2,021	405	135
113	1,721	360	103
moyenne : 133 g	1,942 g	476 mg	174 mg

Tableau 46 - lot traité I.

10 rats maintenus au régime à 10 % de saindoux.

posologie : 15 mg/jour par rat d'acide isobutyl-3 méthyl-5 hexène-3 oïque, pendant 29 jrs.

croissance : poids moyen initial : 55 g
poids moyen après 7 jrs : 66 g
poids moyen après 29 jrs : 131 g Δ = + 98 %

poids du corps (en g)	poids des testicules (en g)	poids des vésicules séminales (en mg)	poids de la prostate (en mg)
136	0,789	86	22
148	1,855	387	110
136	1,220	105	39
115	0,250	72	10
119	0,930	120	72
127	0,780	95	45
136	0,963	130	57
110	0,410	74	17
124	1,155	350	135
moyenne : 131 g	0,928 g	156 mg	56 mg

Tableau 47 - lot traité II.

10 rats maintenus au régime à 10 % de saindoux.

posologie : 15 mg/jour par rat d'acide isobutyl-3 méthyl-5 hexène-3 oïque, pendant 29 jrs.

+ le 7ème jour de l'expérience, 20 mg d'hexahydrobenzoate de testostérone en injection sous-cutanée.

croissance : poids moyen initial : 55 g
poids moyen après 7 jrs : 66 g
poids moyen après 29 jrs : 123 g Δ = + 87 %

poids du corps (en g)	poids des testicules (en g)	poids des vésicules séminales (en mg)	poids de la prostate (en mg)
120	1,294	520	126
121	1,344	580	132
115	1,195	460	114
149	1,300	510	180
134	1,317	560	172
128	0,806	420	145
112	0,952	310	98
132	1,530	490	203
102	1,035	380	126
117	1,340	412	137
moyenne : 123 g	1,211 g	464 mg	143 mg

La réponse obtenue avec la testostérone chez les animaux traités à l'acide isobutyl-3 méthyl-5 hexène-3 oïque correspond donc à celle observée chez des animaux castrés chirurgicalement :

	vésicules séminales	prostate
Témoins	476 mg	174 mg
Traités I (Ac. isobutyl-méthyl-hexène-oïque)	156 mg	56 mg
Traités II (Ac. isobutyl-méthyl-hexène-oïque + testostérone)	464 mg	143 mg

Toutefois, on observe une reprise de poids partielle du testicule après injection de testostérone ; cependant, il n'y a pas de modification histologique importante.

	poids du corps A	poids des testicules B	B / A en %
Témoins	133 g	1,942 g	1,46 %
Traités I (Ac. isobutyl-méthyl-hexène-oïque)	131 g	0,928 g	0,71 %
Traités II (Ac. isobutyl-méthyl-hexène-oïque + testostérone)	123 g	1,211 g	0,99 %

On peut rapprocher ce fait de l'observation de GAARENSTROOM et JONGH (62) qui ont montré que, chez le rat hypophysectomisé, l'injection de testostérone provoque une reprise partielle de poids du testicule atrophié. Cependant, nous ne pouvons pas comparer l'effet de l'acide isobutyl-3 méthyl-5 hexène-3 oïque à celui de l'hypophysectomie puisque les surrénales de nos animaux traités sont hypertrophiées. L'injection de testostérone diminue d'ailleurs le poids de ces surrénales.

	surrénales
Témoins	21 mg pour 100 g
Traités I (Ac. isobutyl-méthyl-hexène-oïque)	34 mg pour 100 g
Traités II (Ac. isobutyl-méthyl-hexène-oïque + testostérone)	25 mg pour 100 g.

b) Influence des acides antimasculinisants sur la teneur en corticostéroïdes et cholestérol de quelques glandes.

Nous avons pratiqué, sur les organes prélevés, un certain nombre de dosages pour nous permettre de préciser ces résultats anatomiques.

Dosage des corticostéroïdes réduisant le bleu de triphényl-tétrazolium dans les surrénales.

Les animaux sont âgés de 9 semaines environ lorsqu'ils sont sacrifiés. Les surrénales sont immédiatement prélevées puis soigneusement homogénéisées dans de l'eau. L'homogénéisat ainsi obtenu est agité soigneusement avec du chlorure de méthylène purifié dans un tube à centrifuger. Par centrifugation, on sépare deux phases : la phase organique qui est prélevée, la phase aqueuse qui est réextraite deux fois avec du chlorure de méthylène. Les extraits méthyléniques sont mélangés, séchés sur sulfate de soude anhydre et évaporés sous vide à basse température. Le résidu est dissous dans un volume déterminé d'alcool éthylique à 95° C privé de réducteur, de manière que cette solution contienne de 20 à 32 µg de corticostéroïdes par cm3.

Le dosage des corticostéroïdes dans cette solution est alors effectué par la méthode de MEYER et LINDBERG (126) qui est une modification de la technique décrite par HENLEY (81).

Dans cette technique, il est nécessaire d'utiliser un alcool à 95° C qui ne donne pas de réaction avec le chlorure de triphényl-tétrazolium.

Réactifs : - réactif alcalin :

6 cm3 de tétraméthyl-ammonium hydroxyde à 10 % dans l'eau (≃ 1,1 N) sont mélangés avec 94 cm3 d'alcool purifié. Pour

l'utilisation, on dilue cette solution à quatre fois son volume.

- réactif coloré :

solution de chlorure de triphényl-tétrazolium à 0,1 % dans l'alcool.

Dosage.

On prélève 1 cm3 d'une solution alcoolique contenant entre 20 et 32 µg de désoxycorticostérone. On ajoute 1 cm3 de réactif coloré, puis 1 cm3 de réactif alcalin. On mélange par renversement et on maintient à 37° C. La mesure de la densité optique à 480 mµ après 15 minutes à 37° C fournit, en se rapportant à une courbe d'étalonnage obtenue au moyen d'une solution étalon de désoxy-corticostérone, la quantité de corticostéroïdes réducteur du bleu de triphényl-tétrazolium contenue dans 1 cm3 de solution alcoolique.

Technique - Préparation de l'extrait surrénalien en vue du dosage.

Les surrénales fraîchement prélevées sont immédiatement homogénéisées dans 25 cm3 d'eau, puis extraites trois fois avec 10 cm3 de chlorure de méthylène. Les extraits organiques, après évaporation, sont redissous dans 3 cm3 d'alcool éthylique. Le dosage est pratiqué sur 1 cm3 de cette solution alcoolique, suivant la technique décrite ci-dessus.

Résultats.

Les résultats obtenus sont les suivants :

Témoins	:	36 µg de corticostéroïdes/100 mg de surrénales
Traités I (acide isobutyl-3 méthyl-5 hexène-3 oïque)	:	19 µg de corticostéroïdes/100 mg de surrénales
Traités II (acide isobutyl-3 méthyl-5 hexène-3 oïque + testostérone)	:	15 µg de corticostéroïdes/100 mg de surrénales.

L'acide isobutyl-méthyl-hexénoïque diminue donc le contenu en corticostéroïdes des surrénales.

Nous avons recherché, dans ces conditions, s'il y avait une diminution de la teneur en cholestérol des surrénales, en effectuant directement le dosage du cholestérol, par la méthode de LIEBERMANN, sur l'extrait au chlorure de méthylène des surrénales.

Les résultats suivants ont été observés :

Témoins : 3,83 mg de cholestérol pour 100 mg de surrénales,
Traités I : 3,88 mg de cholestérol pour 100 mg de surrénales,
Traités II : 3,90 mg de cholestérol pour 100 mg de surrénales.

Ce résultat permet de penser que la diminution des corticostéroïdes surrénaliens n'est pas due à un stress car la teneur en cholestérol y est constante. Nous pouvons donc envisager un effet de ces substances sur la synthèse même des hormones stéroïdes.

Nous pouvons également exprimer ces résultats sous la forme suivante :

- corticostéroïdes surrénaliens.

Témoins : 36 x 0,21 ≒ 7,5 γ/rat Traités I : 19 x 0,34 ≒ 6,5 γ/rat	}	- 13 %

- cholestérol surrénalien.

Témoins : 3,83 x 0,21 ≒ 0,80 mg/rat Traités I : 3,88 x 0,34 ≒ 1,32 mg/rat	}	+ 64 %

ce qui nous permet de constater une élévation importante de la quantité totale de cholestérol des surrénales et une diminution des corticostéroïdes. Ces variations confirment le fait que l'acide isobutyl-3 méthyl-5 hexène-3 oïque n'a pas d'action sur la synthèse du cholestérol dans l'organisme (action hypocholestérolémiante nulle - action sur le cholestérol hépatique nulle) et qu'il agirait plutôt sur la synthèse, à partir du cholestérol,

des hormones corticosurrénaliennes.

Nous avons également dosé le cholestérol dans le testicule car l'action des acides disubstitués βγ-insaturés sur les organes génitaux accessoires semble due à une diminution de la production de testostérone par le tissu interstitiel du testicule.

Les testicules prélevés sont saponifiés par ébullition dans la potasse alcoolique. L'insaponifiable extrait par l'éther est redissous, après évaporation du solvant, dans un volume déterminé de chloroforme. Cette solution chloroformique sert au dosage du cholestérol.

Témoins : 222 mg de cholestérol pour 100 g de testicules,
Traités I : 242 mg de cholestérol pour 100 g de testicules,
Traités II : 229 mg de cholestérol pour 100 g de testicules.

Il n'y a donc pas de modification importante de la teneur en cholestérol du testicule.

6 - Discussion de ces résultats.

Les acides βγ-insaturés disubstitués étudiés ne créent pas de perturbation de la croissance chez les animaux traités. La différence observée se situe en général dans les limites d'erreur

Le ralentissement du développement des testicules qui est d'environ 60 à 70 % chez les jeunes animaux, âgés de 5 à 6 semaines, varie fortement avec l'âge. Par exemple, il devient égal à 40 % chez les animaux âgés de 7 semaines et n'apparaît pratiquement plus chez les rats adultes, après 40 jours de traitement.

En outre, il existe une hyperplasie extrêmement importante des surrénales ; leur poids, chez les animaux témoins, rapporté à 100 g de corps, est d'environ 19 à 20 mg, alors que, chez les

rats traités, il se situe entre 39 et 40 mg pour 100 g de corps. Du point de vue histologique, cette hyperplasie ne touche que la couche fasciculée du cortex surrénalien.

Comment peut-on expliquer ces effets ? il nous faut tout d'abord tenir compte que chez l'animal, mâle ou femelle, il existe un certain équilibre entre la production des hormones oestrogènes (hormones femelles) et la production des hormones androgènes (hormones mâles). Chez le mâle, cette production d'hormones oestrogènes est compensée par une synthèse accrue d'hormones androgènes qui entraînent l'apparition des caractères sexuels mâles. Chez la femelle, il y a production d'androgènes par les surrénales et d'hormones sexuelles femelles par l'ovaire, l'équilibre étant déplacé cette fois-ci dans le sens des hormones sexuelles femelles.

Nous pouvons donc envisager que ces acides créent, chez le mâle, une inhibition de la production des hormones androgènes, sans agir sur la production des hormones oestrogènes. Ceci expliquerait l'effet antimasculinisant, puisque nous savons que les oestrogènes donnés à fortes doses chez des animaux mâles en voie de croissance produisent une inhibition du développement des organes génitaux mâles. On comprendrait également leur effet chez la femelle où nous avons observé à l'autopsie une hypertrophie importante de l'utérus qui correspondrait à une action oestrogène de la substance puisque des oestrogènes administrés à de jeunes rats femelles provoquent le même phénomène. Il est bien improbable d'ailleurs, quand on connaît la spécificité moléculaire nécessaire à l'apparition du pouvoir oestrogène, que ces acides soient oestrogènes par eux-mêmes. Les effets obtenus chez la

femelle proviendraient de la perturbation de l'équilibre existant entre les hormones oestrogènes et endrogènes provoquée par la diminution de la production d'androgènes. La sécrétion d'oestrogènes, restant constante, produit la stimulation de l'utérus observée au cours de notre expérience. Histologiquement, l'utérus de ces jeunes femelles présente un stroma légèrement oedémateux. On ne note pas de modification particulière des surrénales, puisque, chez la femelle, elles sont déjà stimulées par les oestrogènes existants, contrairement au cas des mâles où l'on constate une hyperplasie importante due à l'apparition de cette stimulation.

Nous pouvons donc envisager que les acides βγ-insaturés disubstitués créent, chez l'animal soumis au régime à 10 % de saindoux, un déficit en hormones androgènes qui entraîne une atrophie des organes génitaux accessoires. Ceux-ci conservent d'ailleurs leur intégrité fonctionnelle et répondent à une sollicitation hormonale effectuée au moyen de testostérone.

En outre, le dosage direct des corticostéroïdes surrénaliens, bien qu'approximatif, montre qu'il existe une diminution appréciable du contenu en hormones des surrénales, bien que la teneur en cholestérol y reste constante.

4°) INFLUENCE DES CONSTITUANTS DU REGIME ALIMENTAIRE.

1 - Introduction.

Un heureux concours de circonstances nous a permis de déceler l'effet antimasculinisant des acides βγ-insaturés polysubstitués. En effet, nous allons montrer maintenant qu'une modification partielle de l'alimentation donnée aux animaux entraîne

immédiatement une variation du pouvoir antimasculinisant de ces composés.

Voulant connaître l'influence du saindoux contenu dans le régime utilisé au cours de nos expérimentations antérieures, nous avons administré l'un des composés reconnu comme antimasculinisant à de jeunes rats en voie de croissance, nourris au moyen d'un régime normal standard, du type (II), déjà décrit en détail p. 42 et que nous reproduisons ci-dessous :

	Régime à 10 % de saindoux (I)	Régime normal standard (II)
Farine de maïs	180	180
Farine d'orge	225	225
Farine de luzerne	90	90
Farine de viande	90	90
Levure de bière	18	18
Tourteau d'arachide	45	45
Farine de poissons	90	90
Remoulage	115	115
Condiment porcelet SARB (condiment minéral vitaminé)	45	45
Saindoux	100	0
Amidon	0	100

Le saindoux du régime (I) ayant été remplacé par de l'amidon, la teneur en azote protéique total demeure égale à 21-22 % dans les deux types de régime. Seule la valeur calorifique de la ration qui passe de 30 à 26 calories par 10 g est modifiée du fait du remplacement des lipides par les glucides.

L'expérience a été conduite sur deux groupes de 15 rats, de poids moyen 60 à 65 g au départ, en utilisant l'acide diméthyl-3,5 hexène-3 oïque comme antimasculinisant (Cf. Tableau 48).

Tableau 48 - Essai de l'acide diméthyl-3,5 hexène-3 oïque sur des animaux nourris avec le régime normal standard II.

posologie : 15 mg/j par rat sous forme de sel de sodium.

croissance: Témoins - poids moyen initial : 62 ± 5g
poids moyen après 30j : 133-13g Δ =+ 115%

Traités - poids moyen initial : 60 ± 6g
poids moyen après 30j : 106-13g Δ = + 80%

Témoins			Traités		
poids du corps (en g) A	poids des testicules (en g) B	B / A en %	poids du corps (en g) A	poids des testicules (en g) B	B / A en %
116	1,832	1,58	95	0,410	0,43
115	2,086	1,81	82	0,580	0,71
95	1,535	1,62	84	0,740	0,88
106	1,793	1,67	93	0,834	0,90
123	1,968	1,60	94	0,782	0,83
122	1,806	1,48	80	0,761	0,95
136	2,002	1,48	91	0,750	0,83
169	2,321	1,38	92	0,813	0,88
122	1,815	1,49	Σ 89 g	0,709 g	0,80%
115	1,802	1,57	129	1,463	1,14
107	2,060	1,92	119	2,360	1,98
132	1,815	1,38	115	1,731	1,51
131	2,008	1,52	130	2,200	1,69
152	1,980	1,31	137	1,715	1,26
moyenne : 124 g	1,916 g	1,54 %	103 g	1,160 g	1,12%

En considérant la moyenne des résultats, nous obtenons une inhibition de l'ordre de - 27 $\pm$ 8 %, peu significative, inférieure à celle de 46 % observée dans le cas d'un régime à 10 % de saindoux. Cependant, il nous faut tenir compte de la disparité des résultats : 8 animaux sur 13, dans le groupe traité, présentent une inhibition importante du développement des testicules. Pour ces seuls animaux, le rapport est alors ramené à 0,80 $\pm$ 0,10 %, ce qui correspond à une inhibition de l'ordre de - 48 %.

Mais un fait s'impose après cette expérience : dans les cas où cet acide $\beta\gamma$-insaturé disubstitué produit son effet antimasculinisant, il y a une forte diminution de la croissance des animaux.

Le régime alimentaire intervient donc à la fois sur l'activité et la toxicité des acides $\beta\gamma$-insaturés disubstitués.

2 - Teneurs en éléments azotés du régime et influence de la consommation alimentaire.

Une question se pose immédiatement à la suite de ces résultats : le régime employé est-il équilibré ou, plus précisément, n'existe-t'il pas une carence fruste en un élément que fait apparaître l'administration des composés étudiés ?

L'expérimentation utilisant comme tests quantitatifs les variations de poids d'un organe doit tenir compte de nombreux facteurs externes qui peuvent entraîner des modifications dans la réponse de l'animal. C'est ainsi que DEMPSEY et ROBERTS (48), au cours du dosage de l'activité F.S.H. de l'hypophyse au moyen du test du poids de l'utérus de la souris impubère,

observent, à un moment donné, que le poids des utérus témoins, dans leur élevage, passe de 7 mg à 20 ou 30 mg. Or, cette variation a coïncidé avec un changement de provenance de l'aliment servant de régime de base. Ce fait montre bien l'importance fondamentale de la composition du régime sur les modifications de volume des glandes endocrines.

D'autre part, l'on observe un ralentissement du développement sexuel chez les animaux de laboratoire lorsque l'apport énergétique est diminué de 30 % par rapport à la normale (7).

Les carences en manganèse, cuivre, zinc, cobalt semblent influencer défavorablement le développement des organes génitaux mâles (74). Les carences protéiques provoquent, chez le rat, des troubles de l'activité hypophysaire qui retentissent sur le développement testiculaire (38). La carence en isoleucine entraîne également une atrophie testiculaire (152).

Enfin, signalons l'influence de la vitamine E (53) et des acides gras essentiels (26) dont nous étudierons les effets d'une manière plus approfondie ultérieurement.

Nous avons donc entrepris l'étude de ces différents facteurs, pour essayer d'éclaircir le mode d'action des composés qui se sont révélés antimasculinisants.

Il nous fallait, tout d'abord, vérifier que le régime ne contenait pas un facteur limitant au point de vue teneur en protéines ou en acides aminés. Les différentes farines utilisées pour la préparation de l'aliment étant des produits commerciaux dont la composition moyenne correspond à celle des tables internationales, nous avons calculé les pourcentages en protéines et en acides aminés, d'après les valeurs données dans le tableau 49.

Le dosage d'azote par la méthode de KJELDHAL nous a fourni, en utilisant la relation :

$$N\ \% \times 6{,}2 = \text{protéine}\ \%\ ,$$

une teneur en protéines de 24,3 %, ce qui est en accord avec le chiffre théorique de 21 % environ (Cf. Tableau 50).

Nous avons effectué, dans le tableau 51, la comparaison des pourcentages des différents acides aminés indispensables pour le rat, déterminés pour notre régime, avec les pourcentages nécessaires pour une croissance normale de l'animal. Ceci nous a permis de conclure que nous n'avons pas de facteurs limitants, au point de vue acides aminés pour le rat, dans notre régime.

Tableau 49 - Teneurs en éléments azotés des différentes farines utilisées (20).

	protéines %	Argi-nine %	Ly-sine %	Méthio nine %	cys-tine %	Trypto phane %	Iso-leu-cine %	Leu-cine %	Phényl ala-nine %	Thréo nine %	Va-line %	Histi dine %
Farine de viande	55	3,7	3,1	1,32	0,58	0,35	2,3	4,7	2,4	2,1	2,7	1,4
Farine de poissons	60	3,8	4,0	1,84	0,63	0,69	3,2	4,9	2,7	2,6	3,1	1,5
Farine d'orge	11	0,46	0,81	0,22	0,20	0,15	0,43	0,61	0,44	0,25	0,44	0,18
Farine de maïs	9	0,36	0,22	0,21	0,12	0,06	0,41	1,40	0,44	0,32	0,46	0,22
Farine de luzerne	18	0,78	1,05	0,27	0,20	0,28	0,50	0,80	0,50	0,40	0,60	0,20
Remoulage de blé	16	0,77	0,43	0,27	0,18	0,18	0,76	0,90	0,69	0,41	0,83	0,41
Tourteau d'arachide	48	5,50	1,50	0,55	0,77	0,50	1,50	3,50	2,70	1,20	2,74	0,93
Levure de bière	45	1,90	3,30	0,86	0,45	0,59	2,60	3,20	2,00	2,30	2,40	1,20

Tableau 50 - Teneurs en éléments azotés de notre régime

Composition du régime		protéines %	Arginine %	Lysine %	Méthionine %	cystine %	Tryptophane %	Isoleucine %	Leucine %	Phénylalanine %	Thréonine %	Valine %	Histidine %
Farine de viande	9	4,95	0,33	0,28	0,12	0,05	0,03	0,20	0,42	0,21	0,19	0,24	0,12
Farine de poissons	9	5,40	0,34	0,36	0,18	0,06	0,06	0,29	0,44	0,24	0,23	0,28	0,13
Farine d'orge	22,5	2,47	0,10	0,05	0,06	0,04	0,03	0,10	0,14	0,10	0,05	0,10	0,04
Farine de maïs	18	1,62	0,06	0,04	0,05	0,02	0,01	0,07	0,25	0,08	0,06	0,08	0,04
Farine de luzerne	9	1,62	0,07	0,09	0,03	0,03	0,03	0,04	0,07	0,05	0,03	0,05	0,02
Remoulage de blé	11,7	1,08	0,09	0,05	0,04	0,02	0,02	0,09	0,10	0,08	0,05	0,10	0,05
Tourteau d'arachide	4,5	2,15	0,25	0,07	0,03	0,03	0,02	0,07	0,16	0,12	0,05	0,12	0,04
Levure de bière	1,8	0,82	0,03	0,06	0,02	0	0,01	0,05	0,06	0,04	0,04	0,04	0,02
Saindoux	10	0											
Condiment SARB	4,5	0											
	100	20,91	1,27	1,00	0,53	0,25	0,21	0,91	1,64	0,92	0,70	1,01	0,46

Tableau 51 - Besoins du rat en acides aminés indispensables (pourcentage dans le régime).

	d'après (143)	d'après (3)	d'après (159)	pourcentage nécessaire	pourcentage dans notre régime
Histidine	0,4 %	0,3 %	0,3 %	0,4 %	0,5 %
Isoleucine	0,5 %	0,9 %	0,8 %	0,9 %	0,9 %
Leucine	0,9 %	0,7 %	1,0 %	1,0 %	1,6 %
Lysine	1,0 %	0,9 %	0,8 %	1,0 %	1,0 %
Méthionine	0,6 % (sans cystine)	0,5 %	0,5 %	0,5 % (avec cystine)	0,5 % (+ 0,25% cystine)
Phénylalanine	0,5 %	1,0 %	0,6 %	0,8 %	0,9 %
Thréonine	0,6 %	0,4 %	0,6 %	0,6 %	0,7 %
Tryptophane	0,2 %	0,2 %	0,2 %	0,2 %	0,2 %
Valine	0,7 %	1,1 %	0,7 %	0,8 %	1,0 %
Arginine (non indispensable pour la croissance : 0,2 %)					

La croissance pondérale des animaux a été contrôlée sur toute la durée des expériences, car on risque de considérer comme un résultat valable une variation due seulement à un certain degré d'inanition chez les animaux traités.

En pratique, l'indice de consommation est identique pour les groupes témoin et traité, lorsque la croissance est normale dans les deux groupes. Par exemple, dans le cas de l'acide isobutyl-3 méthyl-5 hexène-3 oïque, administré aux animaux traités à la dose de 15 mg par jour et par rat, nous avons, avec le régime à 10 % de saindoux, la consommation alimentaire suivante :

Témoins - moyenne sur 30 jrs : 14 g par jour et par rat

Traités - moyenne sur 30 jrs : 15 g par jour et par rat,

pour une croissance de :

jours	0	6	13	21	27	34
Témoins	62±6 g	75±5 g	86±5 g	105± 8 g	116± 9 g	130± 9 g
Traités	67±9 g	79±9 g	96±10g	108±11 g	118±12 g	134±14 g

3 - Influence des vitamines contenues dans le régime.

L'existence d'une pré-carence vitaminique peut aussi entraîner quelquefois une atrophie des organes génitaux. Cependant, parmi les différentes vitamines hydro- et liposolubles, seules les carences en vitamines A (122), E (53) et en acides gras essentiels (76) entraînent des modifications importantes du tractus génital mâle, avec atteinte de la lignée séminale. L'effet de la carence en complexe B (113, 128, 153) correspond surtout à une dégénérescence des cellules interstitielles du testicule, alors que la spermatogénèse reste intacte. Pratiquement, nous pouvons donc éliminer l'hypothèse d'une carence fruste en un élément du complexe B, à cause de ses effets différents sur le testicule, ainsi que d'une carence en vitamine A qui, nous le savons, provoque des troubles importants de la croissance.

Il nous reste donc à envisager plus particulièrement l'influence des deux facteurs : vitamine E et acides gras essentiels.

Une seule déficience en vitamine E n'expliquerait pas les effets observés sur les organes accessoires puisqu'une carence en cette vitamine n'a pas d'effet sur le poids de ces glandes, les fonctions hormonales des testicules étant conservées (54).

Cependant, connaissant l'augmentation du besoin en vitamine E que crée un régime riche en graisses (71, 52, 43), nous avons voulu étudier l'effet, sur la croissance et le poids des organes génitaux mâles, d'un supplément de vitamine E. L'expérimentation, d'une durée de 35 jours, a porté sur deux groupes de jeunes rats en voie de croissance, soumis au régime à 10 % de saindoux, l'un des groupes recevant en supplément de l'α-DL-tocophérol de synthèse. Les résultats ont été résumés dans le tableau 52.

Pratiquement, aucune modification de croissance ou de poids des testicules n'a été observée dans les deux groupes.

Nous avons aussi comparé l'influence, sur la croissance des animaux, d'un régime sans saindoux (régime normal standard, décrit p. 169), avec notre régime habituel à 10 % de saindoux, le poids des testicules nous servant en outre de test d'efficacité (Cf. Tableau 53).

Tableau 52 - Régime à 10 % de saindoux.

Durée de l'expérience : 37 jrs.

Croissance - Groupe I - poids moyen initial : 71 g
gain de poids par j. : 3,03 g

Groupe II - poids moyen initial : 76 g
gain de poids par j. : 3,72 g

Groupe I (sans apport supplémentaire)		Groupe II + 0,25 mg d'α-tocophérol par os par jr et par rat	
poids du corps (en g)	poids des testicules (en g)	poids du corps (en g)	poids des testicules (en g)
246	2,535	230	2,045
167	2,235	206	2,306
171	2,535	210	2,480
152	2,410	191	2,475
187	2,565	236	2,608
187	2,450	238	2,340
177	2,435	252	2,720
145	1,526	245	2,417
194	2,385	218	2,627
186	2,300	225	2,330
213	2,562	197	2,468
187	2,062	176	2,303
171	2,545	179	2,210
183	2,315	217	2,490
179	2,300	203	2,400
moyenne : 183 $\pm$ 16 g	2,350 $\pm$ 0,130 g	214 $\pm$ 19 g	2,410 $\pm$ 0,130 g

Tableau 53.

Croissance - Groupe I - poids moyen initial : 73 g
gain de poids par jr : 2,00 g

Groupe II - poids moyen initial : 62 g
gain de poids par jr : 1,72 g

Groupe I Régime I à 10 % de saindoux (pendant 35 jrs)		Groupe II Régime II normal standard (pendant 35 jrs)	
poids du corps (en g)	poids des testicules (en g)	poids du corps (en g)	poids des testicules (en g)
171	2,405	116	1,832
137	2,002	115	2,086
147	2,273	95	1,535
120	1,915	106	1,793
147	2,131	123	1,968
135	2,321	122	1,806
178	2,380	136	2,002
133	1,825	169	2,321
116	2,138	122	1,815
163	2,281	115	1,802
135	1,987	107	2,060
158	2,400	132	1,815
154	2,384	131	2,008
111	1,745	152	1,980
146	1,996		
moyenne : $143^{+}_{-}16$ g	2,140 g	$125^{+}_{-}14$ g	1,930 g

Comme nous pouvons le constater, l'action sur la croissance du régime à 10 % de saindoux semble supérieure à celle du régime sans graisses, puisque le gain de poids quotidien est de 1,72 g avec le régime normal standard et de 2 g avec le régime à 10 % de saindoux, fait qui a d'ailleurs été signalé par de nombreux auteurs (149, 132, 49). Le poids des testicules rapporté à 100 g de corps est sensiblement le même dans les deux groupes.

En résumé, notre régime ne présente pas de déficit en vitamine E et son efficacité sur la croissance et la formation des organes génitaux mâles n'est pas influencée par l'addition de saindoux.

4 - Influence des acides gras insaturés.

Cependant, nos recherches sur l'activité hypocholestérolémiante des acides βγ-insaturés nous avaient amenés à penser que ces acides pouvaient agir sur la désaturation des acides gras, puisque l'indice d'iode des acides gras hépatiques se trouvait fortement abaissé chez les animaux traités ; or, parmi ces acides, l'acide diméthyl-3,5 hexène-3 oïque ainsi que l'acide isobutyl-3 méthyl-5 hexène-3 oïque se sont révélés comme les composés diminuant le plus fortement cet indice d'iode. Cherchant alors qu'elle pouvait être l'influence des graisses insaturées sur cette action, nous avons légèrement modifié le saindoux utilisé dans notre régime en y incorporant de l'huile de maïs, d'indice d'iode très élevé. Dans ces conditions, nous avons constaté une diminution de l'activité antimasculinisante de l'acide diméthyl-3,5 hexène-3 oïque, qui était d'ailleurs parallèle à l'augmentation de l'indice d'iode des acides gras hépatiques des animaux traités (Cf. Tableau 54).

Tableau 54 - Action antimasculinisante de l'acide diméthyl-3,5 hexène-3 oïque en fonction de l'indice d'iode des graisses de dépôt.

posologie - 1ère et 2ème expériences : 15 mg/j par rat pendant 30 jrs
3ème expérience: 30 mg/j par rat pendant 30 jrs.

	Indice d'iode des acides gras hépatiques	Inhibition du développement des testicules	
		poids d. test. / poids du corps en %	Inhibition en %
1ère expérience (indice d'iode du saindoux : 48) (Cf. tableau 33)			
Témoins	128	1,30	
Traités	59 (- 54 %)	0,70	- 46
2ème expérience (indice d'iode du saindoux : 58) (Cf. tableau 55)			
Témoins	123	1,47	
Traités	93 (- 25 %)	0,98	- 32
3ème expérience (indice d'iode du saindoux : 78) (Cf. tableau 56)			
Témoins	137	1,36	
Traités	118 (- 14 %)	1,17	- 12

Tableau 55 - Action antimasculinisante de l'acide diméthyl-3,5 hexène-3 oïque

(régime à 10 % de saindoux - indice d'I_2 = 58)

posologie : 15 mg/j par rat sous forme de sel de sodium, pendant 30 jrs.

Témoins			Traités		
poids du corps (en g) A	poids des testicules (en g) B	B / A en %	poids du corps (en g) A	poids des testicules (en g) B	B / A en %
171	2,025	1,09	130	1,480	1,14
137	2,002	1,48	120	1,615	1,34
147	2,273	1,55	98	0,970	1,00
120	1,915	1,59	105	1,035	0,98
147	2,131	1,45	144	1,176	0,82
135	2,321	1,72	153	1,380	0,90
178	2,380	1,34	115	1,121	0,97
133	1,625	1,23	144	1,445	1,00
116	2,138	1,84	126	1,602	1,27
163	2,281	1,40	167	1,401	0,84
135	1,987	1,47	160	1,826	1,14
156	2,384	1,51	141	1,910	0,78
154	2,400	1,56	125	1,278	1,00
111	1,745	1,57	145	0,995	0,68
146	1,796	1,29			
moyenne :					
143 g	2,093 g	1,47 %	134 g	1,287 g	0,98 %

Tableau 56 - Action antimasculinisante de l'acide diméthyl-3,5 hexène-3 oïque.

(régime à 10 % de saindoux - indice d'I_2 = 78)

posologie : 30 mg/j par rat sous forme de sel de sodium, pendant 30 jrs.

Témoins			Traités		
poids du corps (en g) A	poids des testicules (en g) B	B / A en %	poids du corps (en g) A	poids des testicules (en g) B	B / A en %
125	1,570	1,28	130	1,580	1,21
144	2,235	1,55	120	1,615	1,35
152	2,005	1,32	105	1,035	0,99
127	1,925	1,52	144	1,276	0,89
114	1,684	1,48	153	1,380	0,90
160	1,880	1,18	115	1,121	0,98
154	2,150	1,39	144	1,945	1,35
145	2,410	1,66	126	1,902	1,51
133	1,995	1,49	167	1,501	0,90
160	1,820	1,14	160	1,826	1,14
112	1,920	1,71	141	2,091	1,49
147	1,775	1,22	125	1,378	1,10
156	1,820	1,17	145	1,995	1,37
177	2,075	1,18			
159	2,277	1,45			
moyenne : 144 g	1,980 g	1,36 %	137 g	1,600 g	1,17 %

5 - Conclusion.

Il nous faut déduire de ces expériences que l'effet anti-masculinisant se trouve être le plus intense lorsque l'indice d'iode des acides gras est le plus faible, ce qui a été confirmé aussi dans le cas de l'acide isobutyl-3 méthyl-5 hexène-3 oïque. Or, il a été montré que la quantité d'acides gras essentiels nécessaires aux rats est proportionnelle à la quantité d'acides gras saturés présents dans le régime (84). De ce fait, l'administration des acides βγ-insaturés disubstitués qui bloquent les possibilités de déshydrogénation des acides gras crée un déséquilibre entre la quantité de forme saturée et insaturée. La première manifestation de ce phénomène, l'atrophie du testicule, se développe à ce stade, puisqu'une certaine quantité d'acides gras insaturés est nécessaire pour l'évolution normale des organes génitaux mâles (56). Nous devons rapprocher ces résultats de l'observation de P. MEUNIER (125) qui, dosant la vitamine E dans différentes huiles, a montré que l'huile de foie de morue, connue comme étant un facteur favorisant de la carence en vitamine E, contient une quantité de tocophérol suffisante pour assurer un développement normal du tractus génital mâle. Nous nous trouvons, dans le cas des acides βγ-insaturés aussi bien que dans celui de l'huile de foie de morue, en présence de substances capables de créer un besoin accrû de l'organisme en vitamine E.

Il reste évidemment un grand nombre de facteurs à préciser ; mais un fait demeure : l'effet antimasculinisant des acides βγ-insaturés disubstitués ne se manifeste que lorsque le régime apporte une quantité limitée d'acides gras insaturés.

5°) CONCLUSIONS DU CHAPITRE.

L'action antimasculinisante des acides βγ-insaturés disubstitués paraît assez complexe. L'intervention d'un facteur alimentaire aussi bien sur la toxicité de ces composés que sur leur activité semble probable. Les acides gras saturés du régime jouent vraisemblablement un rôle comme facteur favorisant. Il ne faut pas oublier qu'une disproportion trop grande entre la teneur en acides gras saturés et insaturés de l'alimentation entraîne des troubles organiques : diminution de croissance (40), troubles hépatiques (163). Il existe une proportion optimum entre les acides gras saturés et insaturés favorable au bon développement de l'animal (84). Peut-être provoquons-nous, au moyen des acides insaturés disubstitués, une diminution de l'efficacité des acides gras insaturés. Nous nous trouvons ici à la limite des connaissances actuelles. Il est possible d'apprécier la nécessité ou la non nécessité d'un composé biologique, mais on a encore peu de données sur les proportions relatives des composés qui doivent exister dans un régime alimentaire pour obtenir sa pleine efficacité.

Les résultats que nous avons exposés ici demandent donc à être précisés. En particulier, il nous faudra poursuivre les essais de castration sur un laps de temps plus long pour étudier le devenir des animaux ainsi traités.

Une expérimentation plus poussée de l'influence des graisses insaturées du régime nous permettra de déterminer les conditions optima nécessaires à l'activité antimasculinisante des acides βγ-insaturés disubstitués.

V/ - CONCLUSIONS GENERALES.

Recherchant l'activité inhibitrice sur la biosynthèse du cholestérol d'analogues structuraux d'un de ses précurseurs, l'acide diméthyl-acrylique, nous avons montré que les acides βγ-insaturés substitués en β possèdaient un pouvoir hypocholestérolémiant marqué. Cette activité varie en fonction de la chaîne aliphatique et de la nature des substituants en β .

Parmi les composés étudiés, l'acide éthyl-3 pentène-3 oïque s'est révélé comme l'un des inhibiteurs les plus actifs. Son action antiathéromateuse chez le lapin, soumis à un régime hypercholestérolémié confirme les conclusions obtenues dans notre expérimentation. Ce composé a également présenté un effet favorable dans l'hypercholestérolémie humaine.

Une étude plus poussée de l'action des acides βγ-insaturés nous a rapidement révélé que leur effet sur l'animal était beaucoup plus complexe qu'une seule inhibition de la synthèse du cholestérol. Leur nature d'acides βγ-insaturés diminue leur vitesse de dégradation dans l'organisme où ils peuvent ainsi provoquer des modifications importantes.

C'est ainsi qu'ils agissent, du fait de leur structure, sur la déshydrogénation des graisses en créant une diminution importante de l'indice d'iode des acides gras hépatiques. Ils interviennent certainement sur l'estérification de la molécule de cholestérol.

Toutes ces propriétés : inhibition de la biosynthèse du cholestérol, diminution de la vitesse d'estérification de cette molécule, ralentissement de la synthèse et de la déshydrogénation des acides gras, concourent à leur action anti-athéromateuse.

Parmi ces composés, certains ont présenté un effet antimasculinisant important se manifestant par une inhibition du développement des testicules chez le rat en voie de croissance.

L'étude de la variation de cette activité en fonction de la structure chimique des acides βγ-insaturés nous a permis de préciser que cette propriété apparaissait lorsque deux substituants existaient sur la chaîne carbonée principale.

Cette action antimasculinisante se présente comme une castration chimique et entraîne une atrophie des organes accessoires.

Des essais de stimulation hormonale permettent de penser que la synthèse des hormones androgènes se trouve diminuée. Le dosage direct des corticostéroïdes surrénaliens confirme cette hypothèse. L'effet de ces acides βγ-insaturés disubstitués sur le tractus génital des rats femelles précise ce fait, montrant en outre que la synthèse des oestrogènes ne paraît pas inhibée.

Nous avons pu montrer, d'autre part, que l'activité de ces substances varie en fonction de la composition du régime alimentaire, leur pouvoir antimasculinisant étant inversement proportionnel au rapport acides gras insaturés sur acides gras saturés de l'aliment. Ceci permet de rapprocher l'activité antimasculinisante de ces composés de leur action sur la désaturation des graisses.

Ainsi, cette étude biochimique des acides βγ-insaturés révèle un certain nombre de propriétés jusqu'ici inconnues de ces produits. Leur action biologique provient, pour une grande partie, de leur structure βγ-insaturée qui leur permet d'interférer dans la réaction de déshydrogénation, premier stade de la dégradation des acides gras par β-oxydation.

BIBLIOGRAPHIE.

(1) ABELL (L.L.), MOSBACH (E.H.) et KENDALL (F.E.) - J. Biol. chem., 1956, 220, 527.

(2) ACKERMAN(D.) - Münch. Med. Woch., 1921,68, 12.

(3) ALBANESE (A.A.) et IRBY (V.) - Science, 1943, 98, 286.

(4) ALFIN-SLATER (R.B.), SCHOTZ (M.C.), SHIMODA (F.) et DEUEL (H.J. Jr.) - J. Biol. Chem., 1952, 195, 311.

(5) ANKER (H.S.) et RAPER (R.) - J. Biol. Chem., 1948, 176, 1353.

(6) ARTOM (C.) - Bull. Soc. Chim. Biol., 1932, 14, 1386.

(7) ASDELL (M.) et CROWEL (O.) - 6ème Congrès International de Zootechnie, Copenhague, 1952.

(8) BACHMANN (W.E.) - J. Org. Chem., 1938, 3,434.

(9) BARGETON (D.), KRUMM-HELLER (C.) et TRICAUD (Mlle E.) - C. R. Soc. Biol., 1954, 148, 63.

(10) BAXER (C.G.) et GREENBERG (D.M.) - Cancer Research, 1949, 9, 701.

(11) BERGMANN (E.) et BOGRACHOV (E.) - J. Amer. Chem. Soc., 1940, 62, 3016.

(12) BERNHARD (K.) et RITZEL (G.) - Z. Physiol. Chem., 1953, 295, 187.

(13) BERNHARD (K.) et WAGNER (H.) - dans "Biochemical Problems of Lipids", p. 200 - Butterworths Scientific Publications, London, 1956.

(14) BLOCH (K.) - J. Biol. Chem., 1945, 157, 661.

(15) BLOCH (K.), BOREK (E.) et RITTENBERG (D.) - J. Biol. Chem., 1946, 162, 441.

(16) BLOCH (K.), CLARK (L.C.) et HARARY (I.) - J. Biol. Chem., 1954, 211, 687.

(17) BLOCH (K.) et RITTENBERG (D.) - J. Biol. Chem., 1942, 143, 297.

(18) BLOCH (K.) et RITTENBERG (D.) - J. Biol. Chem., 1942, 145, 625.

(19) BLOCH (K.) et RITTENBERG (D.) - J. Biol. Chem., 1944, 155, 243.

(20) BLOCK (R.J.) et BOLLING (D.) - "The aminoacid composition of protein and food", Springfield, 1947, C.H. Thomas, Edt.

(21) BLOOR (W.R.) - J. Biol. Chem., 1916, 24, 227.

(22) BOLLMAN (J.L.) et FLOCK (E.V.) - Amer. J. Physiol., 1951, 164, 480.

(23) BOUIN (P.) et ANCEL (P.) - Arch. de Zool. Exp. et Génér., 1903, 1, 437.

(24) BOYD (E.M.) - J. Biol. Chem., 1936, 115, 37.

(25) BRADY (R.C.) et GURIN (S.) - J. Biol. Chem., 1951, 189, 371.

(26) BURR (G.C.) et BURR (M.M.) - J. Biol. Chem., 1930, 86, 587.

(27) BUTENANDT (A.) et KUDSZUS (H.) - Z. Physiol. Chem., 1935, 237, 75.

(28) BYERS (S.C.), FRIEDMAN (M.) et MICHAELIS (F.) - J. Biol. Chem., 1951, 188, 637.

(29) BYERS (S.C.), ROSENMAN (R.H.), FRIEDMAN (M.) et BIGGS (M.W.) - J. Exper. Med., 1952, 96, 513.

(30) CAMINADE (R.) - Bull. Soc. Chim. Biol., 1922, 4, 601.

(31) CHAKRAVORTHY (P.N.) et LEVIN (R.H.) - J. Amer. Chem. Soc., 1942, 64, 2.317.

(32) CHANNON (H.J.) et WILKINSON (H.) - Biochem. J., 1936, 30, 1.033.

(33) CHERNICK (S.S.) et CHAIKOFF (I.L.) - J. Biol. Chem., 1950, 186, 535.

(34) CLAYTON (R.B.) et BLOCH (K.) - J. Biol. Chem., 1956, 218, 319.

(35) COTTE (J.) et MALLEIN (R.) - "Recueil des principales techniques électrophotométriques recommandées en biochimie clinique". publié par JOBIN & YVON, Arcueil, Seine.

(36) COTTET (J.), MATHIVAT (A.) et REDEL (J.) - Presse Médicale, 1954, 62, 939.

(37) COOK (J.W.) - J. Chem. Soc., 1931, p. 2524.

(38) COURRIER (R.) et RAYNAUD (R.) - C. R. Soc. Biol., 1932, 109, 881.

(39) COX (G.E.), NELSON (L.G.), WOOD (W.B.) et TAYLOR (C.B.) - Federation Proceed., 1954, 13, 31.

(40) CROCKETT (M.E.) et DEUEL (H.J.) - J. Nutrition, 1947, 33, 187.

(41) CURRAN (G.L.) - J. Biol. Chem., 1951, 191, 775.

(42) DAKIN (H.D.) et WAKEMAN (A.J.) - J. Biol. Chem., 1909, 6, 373.

(43) DAM (H.), GRANADOS (H.) et FRANGE (I.) - Acta Physiol. Scand., 1949, 18, 161.

(44) DAYTON (S.), DAYTON (J.), DRIMMER (F.) et KENDALL (F.E.) - Circulation, 1954, 10, 595.

(45) DELEPINE (M.) et BONNET (C.) - C. R. Acad. Sci., 1909, 149, 39.

(46) DELSAL (J.L.) - Bull. Soc. Chim. Biol., 1944, 26, 99.

(47) DELSAL (J.L.) - Bull. Soc. Chim. Biol., 1946, 28, 441.

(48) DEMPSEY (E.) et ROBERTS (B.) - J. Clin., Endocrin. Metab. 1952, 12, 244.

(49) DEUEL (H.J.), GREENBERG (S.M.), STRAUB (E.), JUE (D.), GOODING (C.M.) et BROWN (C.F.) - J. Nutrition, 1948, 35, 301.

(50) DOHME (A.R.L.), COX (E.H.) et MILLER (E.) - J. Amer. Chem. Soc., 1926, 48, 1688.

(51) DREUX (J.) et COLONGE (J.) - Bull. Soc. Chim., 1955, p. 1312.

(52) EMERSON (G.A.) et EVANS (H.M.) - J. Nutrition, 1944, 27, 469.

(53) EVANS (H.M.) et BURR (G.O.) - Mem. Univers. Californ., 1927, 8, 1.

(54) EVANS (H.M.) et EMERSON (G.A.) - J. Nutrition, 1943, 26, 55.

(55) FAURE (M.) - dans "Techniques de Laboratoire", p. 715 - Masson et Cie, Edt., Paris, 1954.

(56) FERRANDO (R.), JOUANNETEAU (J.), ZWINGELSTEIN (G.) et JACQUES (F.) - Congrès de la Reproduction, Cambridge, juillet 1956.

(57) FEYEL-CABANES (Mme) - C. R. Soc. Biol., 1954, p. 1196.

(58) FICHTER (Fr.) et GISIGER (E.) - Ber., 1909, 42, 4.707.

(59) FILDES (A.) - Lancet, 1940, 1, 955.

(60) FISCHER (R.A.) - "Les méthodes statistiques adaptées à la recherche scientifique". Traduction I. Bertrand, Presses Universitaires de France, 1947.

(61) FRIEDMAN (M.), BYERS (S.O.) et MICHAELIS (F.) - Amer. J. Physiol., 1951, 164, 789.

(62) GAARENSTROOM (J.H.) et JONGH (S.E.) - Acta Brevia Neerland. Physiol. Pharmacol. Microbiol., 1938, 8, 178.

(63) GAFFNEY (G.W.), SCHREIER (K.), DIFERRANTE (N.) et ALTMAN (K.I.) - J. Biol. Chem., 1954, 206, 695.

(64) GARATTINI (S.), MORPUGO (C.) et PASSERINI (N.) - Giorn. Ital. Chemiotherap., 1955, 2, 60.

(65) GARATTINI (S.), PAOLETTI (P.) et PAOLETTI (R.) - Congrès sur l'artériosclérose humaine et expérimentale, Milan, 1956.

(66) GARDNER (H.D.) et HAWORTH (W.N.) - J. Chem. Soc., 95, 1961.

(67) GEY (K.F.), PLETSCHER (A.), ISLER (O.), RUEGG (R.) et WURSCH (J.) - Helv. Chim. Acta, 1957, 90, 2.354.

(68) GIRARDIN (R.) et SPACH (E.) - Bull. Soc. Chim. Biol., 1926, 8, 813.

(69) GLOVER (J.) et GREEN (C.) - Biochem. J.,-1957, 67, 308.

(70) GOFFINET (R.) - C. R. Soc. Biol., 1935, 118, 1.481 et 119, 330.

(71) GOTTLIEB (H.), QUACKENBUSH (F.W.) et STEENBOCK (H.) - J. Nutrition, 1943, 25 433.

(72) GOULD (R.G.), CAMPBELL (D.J.), TAYLOR (C.B.), KELLY (F.B.), WARNER (I.) et DAVIS (C.B.) - Feder. Proceed., 1951, 10, 191.

(73) GOULD (R.G.), TAYLOR (C.B.), HAGERMAN (J.S.), WARNER (I.) et CAMPBELL (D.J.) - J. Biol. Chem., 1953, 201, 519.

(74) GRASHIUS (P.) - 6ème Congrès International de Zootechnie, Copenhague, 1952.

(75) GREEN (D.E.), MII (S.), MALHER (H.R.) et BOCK (R.M.) - J. Biol. Chem., 1954, 206, 1.

(76) GREENBERG (S.M.) et ERSHOFF (B.H.) - Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1951, 78, 552.

(77) GRIGAUT (A.) - C. R. Soc. Biol., 1910, 70, 791 et 827.

(78) GRIGAUT (A.) - C. R. Soc. Biol., 1911, 71, 513.

(79) GRIGAUT (A.) - Bull. Soc. Chim. Biol., 1935, 17, 1.031.

(80) HANUS (J.) - Z. Untersuch. Naht. und Genussm., 1901, 4, 913.

(81) HENLEY (A.A.) - Nature, 1952, 169, 877.

(82) HILL (R.), BAUMAN (J.W.) et CHAIKOFF (I.L.) - Endocrinology, 1955, 57, 316.

(83) HILL (R.), LINAZASORO (J.M.), CHEVALLIER (F.) et CHAIKOFF (I.L.) - J. Biol. Chem., 1958, 233, 305.

(84) HOPKINS (C.Y.), MURRAY (T.K.) et CAMPBELL (J.A.) - Canad. J. Biochem. Physiol., 1955, 33, 1.047.

(85) HOTTA (S.) et CHAIKOFF (I.L.) - J. Biol. Chem., 1952, 198, 895.

(86) HOTTA (S.), HILL (R.) et CHAIKOFF (I.L.) - J. Biol. Chem., 1954, 206, 835.

(87) HOUSSAY (B.A.) - "Physiologie Humaine", Editions Medicales Flammarion, Paris, 1950. p. 976.

(88) HÜBL (B.) - Dinglers Polytech. J., 1884, 253, 281.

(89) HUTCHENS (T.T.), VAN BRUGGEN (J.T.), COCKBURN (R.M.) et WEST (E.S.) - J. Biol. Chem., 1954, 208, 115.

(90) HUTCHENS (T.T.) et YAMADA (P.) - Federat. Proceed., 1953, 12, 283.

(91) JULIA (M.) et SURZUR (J.M.) - Bull. Soc. Chim., 1956, p. 1620.

(92) KANDIAH (G.) et LINDSTEADT (R.P.) - J. Chem. Soc., 1929, p. 2.151.

(93) KARP (A.) et STETTEN (D.) - J. Biol. Chem., 1949, 179, 819.

(94) KEIL (W.) - Z. f. Physiol. Chem., 1942, 274, 175 et 186.

(95) KEIL (W.) - Z. f. Physiol. Chem., 1942, 276, 26.

(96) KOHN (H.I.) - Amer. J. Physiol., 1950, 163, 410.

(97) KON (G.A.R.), LETON (E.), LINDSTEADT (R.P.) et PARSONS (L.G.B.) - J. Chem. Soc., 1931, p. 1.411.

(98) KON (G.A.R.) et LINDSTEADT (R.P.) - J. Chem. Soc., 1925, p. 616.

(99) KON (G.A.R.) et LINDSTEADT (R.P.) - J. Chem. Soc., 1925, p. 623.

(100) KON (G.A.R.), LINDSTEADT (R.P.) et MACLENNAN (G.W.G.) - J. Chem. Soc., 1932, p. 2.454.

(101) KON (G.A.R.) et NARGUND (K.S.) - J. Chem. Soc., 1932, p. 61.

(102) KORENCHEVSKY (V.) et DENNISON (M.) - J. Pathol. Bacteriol., 1936, 42, 61.

(103) KRIEGER (L.) et KRIEGER (Mme) - Ann. Biol.Clin., 1945, 6, 141.

(104) KÜSTER (J.) - Z. Physiol. Chem., 1895, 18, 171.

(105) KUTCHEVSKY (D.), MOYER (A.W.), TESAR (W.C.), Mc CANDLESS (R.F.J.), LOGAN (J.B.), BROWN (R.A.) et ENGLERT (H.E.) - Angiology, 1956, 7, 156.

(106) LEMELAND (P.) - Bull. Soc. Chim. Biol., 1921, 3, 134 et 1932, 4, 300.

(107) LIEBERMANN (C.) - Ber., 1885, 18, 1803.

(108) LINDSTEADT (R.P.) - J. Chem. Soc., 1927, p. 362.

(109) LONDON (I.M.) et RITTENBERG (D.) - J. Biol. Chem., 1950, 184, 687.

(110) LOSSOW (W.J.), BROWN (G.W.) et CHAIKOFF (I.L.) - J. Biol. Chem., 1956, 220, 839.

(111) LOSSOW (W.J.) et CHAIKOFF (I.L.) - Arch. Biochem. Biophys., 1955, 57, 23.

(112) LOWRY (N.) - J. Chem. Soc., 1899, 75, 224.

(113) LUTWAK-MANN (C.) et MANN (T.) - Nature, 1950, 165, 556.

(114) LYNEN (F.) - Bull. Soc. Chim. Biol., 1953, 35, 1.065.

(115) LYNEN (F.) - Nature, 1954, 174, 962.

(116) LYNEN (F.), REICHERT (E.) et RUEFF (L.) - Ann. Chem., 1951, 574, 1.

(117) MACHEBOEUF (M.) et DELSAL (J.L.) - Bull. Soc. Chim. Biol., 1942, 24, 296.

(118) MALHER (H.R.) - Federat. Proceed., 1953, 12, 694.

(119) MARX (W.), GUSTIN (S.T.) et LEVI (C.) - Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1953, 83, 143.

(120) MASRI (M.S.), LYON (I.) et CHAIKOFF (I.L.) - J. Biol. Chem., 1952, 197, 621.

(121) MAYER (A.) et SCHAEFFER (G.) - C. R. Soc. Biol., 1912, 72, 362.

(122) MAYER (J.) et TRUANT (A.P.) - Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1949, 72, 436.

(123) MENTZER (C.) - Actualités Pharmacologiques. R. HAZARD - Masson & Cie, Edt., 1950, p. 159-178.

(124) MENTZER (C.), ZWINGELSTEIN (G.) et JOUANNETEAU (J.) - C. R. Acad. Sci., 1956, 242, 943.

(125) MEUNIER (P.) et VINET (A.) - Bull. Soc. Chim. Biol., 1942, 24, 365.

(126) MEYER (A.S.) et LINDBERG (M.C.) - Anal. Chem., 1955, 27, 813.

(127) MIESCHER (K.) - Schweiz. Med. Wochschr., 1937, 67, 537.

(128) MOORE (G.R.) et SAMUELS (L.T.) - Amer. J. Physiol., 1931, 96, 278.

(129) MULINOS (M.G.) et POMERANTZ (L.) - J. Nutrition, 1940, 19, 493.

(130) MULKHERJEE (S.), ACHAYA (K.T.), DEUEL (H.J.) et ALFIN-SLATER (R.B.) - J. Biol. Chem., 1957, 226, 845.

(131) NELSON (W.C.) - Cold Spring Harbor Symposia on Quant. Biol., 1937, 5, 123.

(132) PARRISH (D.B.), SHINER (E.R.) et HUGHES (J.S.) - J. Nutrition, 1946, 31, 321.

(133) PERRAULT (M.), ZWINGELSTEIN (G.), JOUANNETEAU (J.) et MENTZER (C.) - Pathologie et Biologie, 1959, 7, 411.

(134) PHIL (A.), BLOCH (K.) et ANKER (H.S.) - J. Biol. Chem., 1950, 183, 441.

(135) POPJAK (G.) et BEECKMAN (H.L.) - Biochem. J., 1950, 47, 233.

(136) POSNER (T.) - J. Prakt. Chem., 1910, 82, 425.

(137) REDEL (J.) et COTTET (J.) - C. R. Acad. Sci., 1953, 236, 2.553.

(138) REFORMATSKY (S.) - Ber., 1887, 20, 1.210.

(139) REFORMATSKY (S.) - J. Prakt. Chem., 1896, 54, 469.

(140) REFORMATSKY (S.) - Beilstein, II, p. 446.

(141) REICH (E.) et LEHNINGER (A.L.) - Biochem. Biophys. Acta, 1955, 17, 136.

(142) REID (R.L.) et LEDERER (M.) - Biochem. J., 1952, 50, 60.

(143) ROSE (W.C.) - Proc. Inst. Med. Chicago, 1939, 12, 98.

(144) ROSSI (C.A.) et SANGUINETTI (F.) - Giorn. di Biochim., 1955, 4, 240.

(145) RUPE (H.) et LOTZ (W.) - Ber., 1903, 36, 15.

(146) SABA (N.) et HECHTER (O.) - Federat. Proceed., 1955, 14, 775.

(147) SABA (N.), HECHTER (O.) et STONE (D.) - J. Amer. Chem. Soc., 1954, 76, 3.862.

(148) SALKOWSKI (E.) - Arch. Ges. Physiol., 1872, 6, 207.

(149) SCHANTZ (E.J.), ELVEHJEM (C.A.) et HART (E.B.) - J. Dairy Sci., 1940, 23, 181.

(150) SCHOENHEIMER (R.) et SPERRY (W.M.) - J. Biol. Chem., 1934, 106, 745.

(151) SCHROETER (G.) - Ber., 1904, 37, 1.090.

(152) SCOTT (E.B.) - Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1956, 92, 134.

(153) SEGALOFF (A.) et SEGALOFF (E.) - Endocrinology, 1944, 34, 346.

(154) SIDRE (P.A.), CHAIKOFF (I.L.) et DAUBEN (W.G.) - J. Biol. Chem., 1948, 176, 829 et 1950, 182, 629.

(155) SOBEL (A.E.), KAYE (I.A.) et SPOERRI (P.E.) - J. Amer. Chem. Soc., 1942, 64, 471.

(156) SOBEL (A.E.) et MAYER (M.) - J. Biol. Chem., 1945, 157, 255.

(157) SPERRY (W.M.) - Amer. J. Clin. Path., 1938, 8, 91.

(158) STAPLE (E.), LYNN (W.S.) et GURIN (S.) - J. Biol. Chem., 1956, 219, 845.

(159) STEFFEE (C.H.), WISSLER (R.W.), HUMPHREYS (E.M.), BENDITT (E.P.), WOODBRIDGE (R.W.) et CANNON (P.R.) - J. Nutrition, 1950, 40, 483.

(160) STERN (J.R.) et DEL CAMPILLO (A.) - J. Biol. Chem., 1956, 218, 985.

(161) STERN (J.R.), DEL CAMPILLO (A.) et LEHNINGER (A.L.) - J. Amer. Chem. Soc., 1955, 77, 1.073.

(162) STETTEN (D.) et KLEIN (B.V.) - J. Biol. Chem., 1946, 162, 377.

(163) STETTEN (D.) et SALCEDO (J.) - J. Nutrition, 1945, 29, 167.

(164) STOERMER (R.) et FRIDERICI (E.) - Ber., 1908, 41, 324.

(165) STOERMER (R.) et VOHT (G.) - Ann. Chem., 1915, 409, 38.

(166) SWELL (L.), TROUT (E.C. Jr.), HOPPER (J.R.), FIELD (H. Jr.) et TREADWELL (C.R.) - J. Biol. Chem., 1958, 233, 49.

(167) SWELL (L.), TROUT (E.C. Jr.), HOPPER (J.R.), FIELD (H. Jr.) et TREADWELL (C.R.) - J. Biol. Chem., 1958, 232, 1.

(168) TEERI (M.) - J. Biol. Chem., 1944, 156, 279.

(169) THANNHAUSER (S.J.) et SEITZ (P.) - J. Biol. Chem., 1936, 116, 533.

(170) TOMKINS (G.M.) et CHAIKOFF (I.L.) - J. Biol. Chem., 1952, 196, 569.

(171) TOMKINS (G.M.), SHEPPARD (H.) et CHAIKOFF (I.L.) - J. Biol. Chem., 1953, 201, 137.

(172) VAHOUNY (G.V.) et TREADWELL (C.R.) - Amer. J. Physiol., 1957, 191, 179.

(173) VAN BRUGGEN (J.T.), HUTCHENS (T.T.), CLAYCOMB (C.K.), CATHEY (W.J.) et WEST (E.S.) - J. Biol. Chem., 1952, 196, 389.

(174) VELLUZ (L.) - Bull. Soc. Chim. Biol., 1933, 15, 845.

(175) WAELSCH (H.), SPERRY (W.M.) et STOYANOFF (V.A.) - J. Biol. Chem., 1940, 135, 291.

(176) WAKIL (S.J.) et MALHER (H.R.) - J. Biol. Chem., 1954, 207, 125.

(177) WALLACH (O.) - Ann., 1902, 323, 159.

(178) WALLACH (O.) - Ann., 1907, 353, 288.

(179) WALLACH (O.) - Ann., 1909, 365, 255.

(180) WESTON (P.G.) - J. Biol. Chem., 1916, 28, 383.

(181) WHITNEY (J.) et ROBERTS (S.) - Amer. J. Physiol., 1955, 181, 446.

(182) WINDAUS (A.) - Ber., 1909, 42, 238.

(183) WOODS (D.D.) - Brit. J. Exp. Path., 1940, 21, 38 et 78.

(184) WOODWARD (R.B.) et BLOCH (K.) - J. Amer. Chem. Soc., 1953, 75, 2.023.

(185) WOOLLEY (D.W.) - "A study of Antimetabolites", J. Wiley & Sons, Edt., New-York, 1952.

(186) WYS- (J.J.A.) - Ber., 1898, 31, 750.

(187) ZWINGELSTEIN (G.) et JOUANNETEAU (J.) - IVème Congrès International de la Nutrition, Paris, juillet 1957.

(188) ZWINGELSTEIN (G.) et JOUANNETEAU (J.) - C. R. Acad. Sci., 1958, 246, 1.320.

(189) ZWINGELSTEIN (G.), JOUANNETEAU (J.) et MENTZER (C.) - Congrès de l'Association Française pour l'avancement des Sciences, Dijon, juillet 1956.

TABLE DES MATIERES.

pages

I/ - INTRODUCTION GENERALE 1

1°) INTRODUCTION 2

2°) HYPOTHESES DE RECHERCHES 3

3°) ANALOGUES STRUCTURAUX DES PRECURSEURS DU CHOLESTEROL 5

4°) PLAN DE TRAVAIL 7

II/ - Première Partie : EXPOSES DES TECHNIQUES EXPERIMENTALES 8

1°) PREPARATIONS CHIMIQUES DES ACIDES INSATURES 9

1 - Etude théorique 9

a) Préparation des β-hydroxy-esters 9

b) Déshydratation des β-hydroxy-esters 10

c) Saponification des esters insaturés 11

2 - Composés étudiés 16

2°) METHODES ANALYTIQUES 25

1 - Analyse des tissus 25

a) Détermination du cholestérol hépatique ... 25

- Extraction du cholestérol 25
- Dosage du cholestérol 27

b) Détermination des acides gras hépatiques. 29

- Extraction 29
- Mesure de l'indice d'iode 30

c) Validité des techniques proposées 33

- Méthodes de référence 33
  - α) Extraction des lipides totaux ... 33
  - β) Dosage du cholestérol libre 34
  - γ) Dosage du cholestérol total et des acides gras 34
- Validité de la technique simplifiée utilisée dans ce travail 36

Pages

2 - Détermination du cholestérol sérique 37

a) Dosage du cholestérol total 37

b) Dosage du cholestérol libre et estérifié .. 39

3°) MATERIEL BIOLOGIQUE 41

1 - Animaux et Aliments utilisés 41

2 - Cholestérolémie moyenne 44

III/ - Deuxième Partie : RECHERCHES DE COMPOSES HYPO-CHOLESTEROLEMIANTS 45

1°) MISE AU POINT DU PROTOCOLE D'EXPERIMENTATION BIOLOGIQUE 46

1 - Variations physiologiques de la biosynthèse du cholestérol 46

a) Lieu et vitesse 46

b) Influence de l'âge sur la vitesse de biosynthèse du cholestérol 48

c) Influence des facteurs nutritionnels 53

d) Influence des facteurs endocriniens 55

2 - Etude expérimentale de l'influence des graisses du régime 56

a) Sur le cholestérol hépatique 57

b) Sur la croissance et le poids des organes.. 59

c) Sur la cholestérolémie 61

3 - Protocole expérimental préconisé 65

2°) RESULTATS OBTENUS 66

1 - Tableau récapitulatif 66

2 - Résultats détaillés 69

3°) DISCUSSION DES RESULTATS 88

1 - Activité comparée des acides αβ- et βγ-insaturés 88

2 - Variation de l'activité des acides βγ-insaturés en fonction de leurs structures chimiques 90

pages

a) Influence de la nature des substituants .. 90

b) Influence de la forme stérique 94

c) Tableau 96

4°) MECANISME D'ACTION 98

1 - Différence d'activité des acides αβ- et βγ-insaturés 98

a) Comparaison de la vitesse de dégradation in vitro des acides αβ- et βγ-insaturés .. 98

b) Comparaison de l'action sur les acides gras hépatiques 103

2 - Etude du mécanisme d'action de quelques-uns des acides βγ-insaturés actifs comme hypocholestérolémiants 105

a) Etude de l'action hypocholestérolémiante dans d'autres conditions expérimentales .. 105

b) Relation entre l'action sur les acides gras hépatiques et l'action hypocholestérolémiante 108

- Mécanisme d'absorption du cholestérol. 108
- Action de l'acide éthyl-3 pentène-3 oïque sur les constituants des lipides hépatiques 110
- Variations de l'effet sur le cholestérol et les acides gras hépatiques en fonction de la structure 113

c) Action de l'acide éthyl-3 pentène-3 oïque sur la lipémie post-prandiale 120

d) Conclusion 123

5°) CONCLUSIONS DU CHAPITRE 124

IV/ - Troisième Partie : ACTION ANTIMASCULINISANTE DES ACIDES βγ-INSATURES POLYSUBSTITUES 126

1°) INTRODUCTION 127

2°) ETUDE DE LA RELATION STRUCTURE-ACTIVITE 130

1 - Variation en fonction de la structure ... 130

2 - Tableaux détaillés des essais 136

pages

3°) ETUDE DE L'ACTION DES ACIDES DISUBSTITUES βγ-INSATURES 145

1 - Effets chez le rat mâle en voie de croissance. 145

a) Effets sur la croissance 146

b) Effets sur les organes accessoires et les surrénales 147

c) Etude histologique des différentes glandes atrophiées 149

2 - Effets chez le rat femelle en voie de croissance 150

a) Effets sur la croissance 150

b) Effets sur les organes génitaux et les surrénales 151

c) Etude histologique des différents organes . 152

3 - Essai de gestation 152

4 - Importance de l'âge des animaux sur l'action antimasculinisante 153

5 - Etude biologique de l'effet antimasculinisant. 157

a) Influence d'injection de testostérone sur l'effet antimasculinisant 157

b) Influence des acides antimasculinisants sur la teneur en corticostéroïdes et cholestérol de quelques glandes..... 163

6 - Discussion de ces résultats 166

4°) INFLUENCE DES CONSTITUANTS DU REGIME ALIMENTAIRE SUR L'ACTIVITE DES ACIDES DISUBSTITUES βγ-INSATURES 168

1 - Introduction 168

2 - Teneurs en éléments azotés du régime et influence de la consommation alimentaire 171

3 - Influence des vitamines contenues dans le régime 177

4 - Influence des acides gras insaturés 181

5 - Conclusion 185

pages

5°) CONCLUSIONS DU CHAPÎTRE 186

V/ - CONCLUSIONS GENERALES 187

BIBLIOGRAPHIE 189

DEUXIEME THESE

Propositions données par la Faculté

EFFETS BIOLOGIQUES DE LA VITAMINE E CHEZ LES MAMMIFERES.

Vu :
Les Membres du Jury

MM. D. CORDIER
J. CHOPIN
G. PERES
C. MENTZER

Vu et approuvé :
Le Doyen de la Faculté des Sciences

H. GAUTHIER

Vu et accordé le permis d'imprimer :

Lyon, le 19 FEVRIER 1960.

Le Recteur,
Président du Conseil de l'Université,

A. ALLIX